

Cassius de Melo Benites

**ESTUDO SOBRE A PROPOSTA DE METODOLOGIA PARA
ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES E
FÓSFORO E CLOROFILA 'A' PARA EMPREGO NOS EXAMES
PERICIAIS DE UNIDADES DE CRIMINALÍSTICA DA POLÍCIA
FEDERAL**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Perícias Criminais Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos
Santos Madureira

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Benites, Cassius de Melo

Estudo sobre a proposta de metodologia para ensaios de determinação das concentrações de fósforo e clorofila 'a' para emprego nos exames periciais de unidades de criminalística da Polícia Federal / Cassius de Melo Benites ; orientador, Luiz Augusto dos Santos Madureira - Florianópolis, SC, 2014.

64 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia.

Inclui referências

1. Ecologia. 2. Espectrofotometria. 3. Fósforo Total. 4. Clorofila. 5. Polícia Federal. I. Madureira, Luiz Augusto dos Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. III. Título.

Este trabalho é dedicado às unidades de criminalística e a todos aqueles que atuam na área de química forense no Brasil.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Pricila pelo apoio, incentivo e compreensão durante o período dedicado a este Mestrado;

Às estagiárias Natália e Rayssa, pelo apoio nos trabalhos de laboratório nas primeiras fases do estudo no SETEC/PR e aos Peritos Criminais Federais Adriana, Fabiano e Franus, do GTPLAB do SETEC/PR, pelas dicas técnicas na época do ministério das disciplinas.

A todos os fornecedores, especialmente da empresa REAGEN, de Colombo/PR, em especial à Jucélia e à Cristiane, pela dedicação na obtenção para venda de equipamentos e reagentes.

Às pesquisadoras Leidiane e Cristina, do CEPPA/UFPR, pelas dicas operacionais e pelo fornecimento de reagentes para teste em colaboração às primeiras fases do trabalho realizado.

Aos Peritos Criminais Federais lotados no SETEC/SC, aos PCF's Cristiano e Becker, pelas conversas descontraídas no dia-a-dia do laboratório e, especialmente, ao PCF Athos, pelo envolvimento tão enriquecedor ao trabalho, nas conversas sobre Espectrofotometria.

Ao Professor Luiz Madureira, pela orientação neste Mestrado, e à Professora Cristina Nunes, pela contribuição técnica para este Trabalho.

Ao PCF Belarmino, pela gentil cessão do laboratório do SETEC/SC na fase final dos desenvolvimentos dos métodos, em postura generosa distinta entre os Chefes dos SETEC da Polícia Federal.

Ao Thiago, nosso 'filho', posso dizer, e à Catarina, que ainda está na barriga da mãe, por fazer-me sentir cada vez mais em família em Florianópolis/SC.

"Deixo cada um viver segundo a sua compleição, e aceito que os que assim o queiram morram pelo que acreditam ser o seu bem, contanto que seja permitido, a mim, viver pela verdade. (...) A mais produtiva atividade a que um ser humano pode dedicar-se é aprender para compreender, porque compreender é ser livre. "

B. Spinoza.

RESUMO

A investigação sobre a influência da variação das condições de preservação e de preparação de amostras subsidia a melhor confecção de um Procedimento Operacional Padrão (POP) na determinação da concentração dos analitos de interesse, no caso presente, o fósforo e a clorofila *a*. Neste estudo, foram investigadas as influências causadas pela variação da temperatura de preservação da amostra e pela variação do tempo entre a amostragem e o ensaio em laboratório sobre os resultados das concentrações dos analitos de interesse. A preparação das amostras foi feita por via-úmida em instalação do laboratório de química de um dos Setores Técnico Científicos da Polícia Federal. A metodologia foi elaborada com base em procedimentos operacionais padrões adotados em diferentes laboratórios de análise de água. A utilização do equipamento de espectrofotometria com arranjo de diodos - DAD permite a visualização de todo o espectro de absorção da amostra na faixa visível e Ultra Violeta - UV o que permite, principalmente nos estudos de cinética de reações, a visualização do comportamento da absorbância do analito e dos compostos interferentes nas diferentes regiões do espectro, facilitando a escolha do comprimento de onda adequado para a determinação da concentração do analito de interesse no âmbito do método utilizado naquele aparelho. De posse dos resultados, pôde-se concluir sobre a viabilidade do aproveitamento de amostras colhidas em campo quando estas estão sujeitas às variações de preservação ora investigadas. Os resultados indicaram que existe uma faixa linear de resposta de absorbância para concentrações até aproximadamente 0,8 mg/L de fósforo na amostra. Em ensaios de viabilidade de temporal de amostras coletadas em campo, observou-se que um decaimento significativo da concentração de fósforo em alíquotas não preservadas, indicando a adesão de formas orgânicas contendo o analito de interesse, o ortofosfato, nas paredes do recipiente ou sua precipitação em compostos orgânicos mais pesados. Foram obtidas boas recuperações do analito ortofosfato em amostras ambientais fortificadas, tanto em análise direta quanto após digestão com persulfato de potássio. Na análise quantitativa de clorofila *a*, com calibração por meio de modelamento matemático, obteve-se resultados que puderam ser utilizados na estimativa de índice de estado trófico de corpos d'água examinados.

Palavras-chave: Espectrofotometria, Fósforo Total, Clorofila, Polícia Federal.

ABSTRACT

Investigation of influence of the variation condition of the preparation and preservation of superficial water samples help to a better formulation of a Standard Operational Procedure in the determination of the concentration of the analytes of interest, this case, the Phosphorus and the Chlorophyll *a*. In this study, were investigated the influences caused by the variation of temperature and time between the event of sampling and laboratory procedures over the result of concentrations of interest analytes. The preparation of samples was done by wet procedures in a chemistry laboratory of one of the Regional Technical Scientific Sectors of the Brazilian Federal Police. The methodology was elaborated based in procedures adopted in different water study laboratories. The utilization of spectrophotometry equipment with diode-array detector - DAD allows a visualization of all the absorption spectrum of the sample in the visible and the ultra-violet band (UV-Vis). This analysis provides especially in the studies of the kinetics of reactions, to visualize the behaviour of absorbance of the analyte and other interferent compounds in the different regions of the spectrum, supporting the choice of the more appropriate wavelength to the determination of concentration of the analyte of interest among the method employed in that equipment. With the results, it could conclude about the viability of the usage of samples collected in field when those were subjected to variations of preservation now investigated. The results indicated that there is one linear response of absorbancy to concentrations up to 0,8 mg/L of phosphorus range in the sample. The assessment of the influence of time to sample collected on field showed a significant decrease of phosphorus concentrations in non-preserved aliquots, indicating the effect of a probable adhesion of organic forms containing the analyte of interest – the orthophosphate, on the walls of the containing recipient or precipitated on heavier organic compounds. There were obtained good recovery results of orthophosphate on fortified environmental samples on direct analisys as well as after potassium persulphate digestion procedures. Quantitative analisys of Clorophyll *a* calibrated by a concentration mathematical equation resulted on data that could lead to the evaluation of a trophic state index of the streams examined.

Keywords: Spectrophotometry. Total Phosphorus. Chlorophyll, Brazilian Federal Police.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico da Transmitância em função do Comprimento de Onda na faixa do espectro Ultra-Violeta de cubetas em diferentes materiais. Fonte: Agilent, 2013.....	29
Figura 2: Diagrama das diferentes espécies de fósforo em solução aquosa. (APHA/SM, 2012, traduzido).....	35
Figura 3: Estrutura das clorofilas a e b. (Streit et ali, 2005).....	37
Figura 4: Representação da molécula de Fosfomolibdato de Amônio (CAS nº 12026-66-3).....	44
Figura 5: Esquema de disposição de equipamentos no método.....	58
Figura 6: Gráfico da curva de absorbância média, sem correção de zero, e indicação da faixa linear de calibração, médio.....	73
Figura 7: Gráfico com os espectros de absorbância para diferentes concentrações de padrões.....	75
Figura 8: Gráficos de tendência temporal e erro relativo da amostra reagida.....	78
Figura 9: Gráfica de leituras de absorbância entre os pontos de calibração de curva não digerida, em alaranjado, e de curva digerida, em azul	83
Figura 10: Resultado das concentrações obtidas pelos ensaios para a determinação de Fósforo Total das amostras ambientais fortificadas.....	88
Figura 11: Espectrogramas de Absorbância de diferentes diluições de solução em Acetona 9:1 de clorofila obtida a partir de maceração de folhas vegetais.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplo de formato de tabela para dados de campo e resultados de análises.....	27
Tabela 2: Especificações Ópticas do Espectrofotômetro Agilent UV-Vis modelo 8453 (Agilent, 2013).....	28
Tabela 3: Comprimento de onda de cut-off de solventes. O comprimento de onda de cut-off corresponde ao qual a transmitância através de um caminho óptico de 10mm é < 25%.(Agilent, 2003, 2013).....	30
Tabela 4: Faixa de comprimentos de onda das diferentes cores e respectivas cores intermediárias (cor visível da amostra) (Ohlweiler, 1981, citado em Lana, 2008).....	32
Tabela 5: exemplo de usos industriais de compostos contendo fósforo.....	33
Tabela 6: Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas doces (salinidade < 0,5‰) - Enquadramento/Lançamento...	38
Tabela 7: Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas salobras (salinidade entre 0,5‰ e 30‰)- Enquadramento/Lançamento.....	38
Tabela 8: Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas salinas (salinidade acima de 30‰) - Enquadramento/Lançamento.....	39
Tabela 9: tipos de armazenamentos e preservação dos reagentes para a determinação de fósforo.....	49
Tabela 10: faixas de calibração, em mg/L P, em função do caminho óptico da cubeta, por fontes diversas.....	55
Tabela 11: características das tubulação utilizados na montagem da células de fluxo.....	59
Tabela 12: Exemplo hipotético de resultados de medições feitas por outros laboratórios.....	65
Tabela 13: volumes de amostra e reagente combinado utilizados na formulação dos padrões de calibração.....	71
Tabela 14: resultados das leituras e regressão linear das medições dos padrões de calibração.....	74

Tabela 15: dados de leitura de absorbância à 880 nm de amostra reagida, em função do tempo. O valor da leitura à 15 minutos é considerado como o de referência.....	77
Tabela 16: Dados para a determinação do Limite de Detecção do Método proposto.....	79
Tabela 17: Resultados das leituras na determinação dos Limites de Controle Superior e Inferior dos valores padrão para as concentrações de 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,00mg/L P, utilizando 5 amostras de laboratório fortificadas, na calibração da Eq. 13 ($K_c = 1,3826$).....	80
Tabela 18: Determinação do erro das leituras dos Brancos de Laboratório Fortificados - BLF na verificação da conformidade dos resultados, os quais devem estar no interior da faixa de 90 a 110% do valor de referência.....	81
Tabela 19: Registro dos resultados para controle interno das leituras da Solução de Verificação de Performance do Instrumento - SVPI.....	82
Tabela 20: resultados das leituras e regressão linear das medições dos padrões de calibração.....	83
Tabela 21: Determinação das concentrações de fósforo resultantes de diferentes procedimentos.....	85
Tabela 22: Determinação do erro das leituras dos Brancos de Amostra, preparados em função da espécie de fósforo examinada.....	86
Tabela 23: Resultados das concentrações de Fósforo Total após análise com variações no tempo e temperatura de preservação das amostras.....	87
Tabela 24: Valores da Recuperações do analito Ortofosfato em amostra ambientais fortificadas digeridas.....	92
Tabela 25: relação dos pontos de coleta das amostra ambientais.....	93
Tabela 26: Classe de estado trófico e suas caracterísacias principais. Fontes: CETESB (2011).....	115
Tabela 27: Resultados das leituras de absorbância em diferentes comprimentos de onda para amostras em diferentes diluições contendo clorofila.....	91
Tabela 28: Resultados das leituras de absorbância em diferentes comprimentos de onda para amostras em diferentes diluições contendo clorofila.....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - grau na escala Celsius

ANA - Agência Nacional de Águas

APP - Área de Preservação Permanente

APHA/SM - American Public Health Association / Standard Methods

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (SMA/SP)

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQ/VP - Controle de Qualidade / Verificação de Performance

DAD - Detector por Arranjo de Diodos

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão

IC - Instituto de Criminalística

ICMBio - Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade

IET - Índice de Estado Trófico

mg/L P- unidade de concentração, miligramas de fósforo por litro.

N - concentração Normal, ou massa molar por litro

pH - potencial de hidrogênio

PROMOTEC - Programa Modernização Tecnológica (SENASP/MJ)

psi - unidade de pressão, pounds per square inch, ou libras por polegada quadrada

R - coeficiente, raiz quadrada do Coeficiente de Determinação de técnica de regressão linear

SETEC - Setor Técnico Científico (Polícia Federal)

UA - Unidades de Absorbância

USEPA - United States Environment Protection Agency

UV-Vis - abreviação, Espectrofotômetro de Banda Visível e Ultra-Violeta

SR/DPF - Superintendência Regional de Polícia Federal

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Contexto Profissional.....	25
1.2 Discussão sobre o equipamento.....	28
1.3 Analito FÓSFORO.....	32
1.4 Analito CLOROFILA A.....	36
1.5 Legislação sobre o tema.....	37
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo Geral.....	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41
3 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS DE INTERESSE (METODOLOGIA).....	43
3.1 Proposta de Método para a Determinação de FÓSFORO em amostra de água.....	43
3.1.1 Escopo e Aplicação.....	43
3.1.2 Sumário do Método.....	43
3.1.3 Definições.....	44
3.1.4 Equipamentos, Suprimentos e Montagens.....	46
3.1.5. Reagentes e Padrões.....	47
3.1.6. Coleta, Preservação e Armazenamento da Amostra.....	49
3.1.7 Avaliação da Performance de Laboratório.....	50
3.1.8. Controle de Qualidade.....	53
3.1.9 Calibração e Padronização.....	55
3.1.10 Procedimento.....	56
3.1.11 Análise de Dados e Cálculo.....	63
3.1.13 Performance do Método.....	65
3.2 Proposta de Método para a determinação de CLOROFILA 'A' em amostras de água.....	66
3.2.1 Aplicação.....	66
3.2.2 Sumário do Método.....	66
3.2.3 Preservação da Amostra e Preparação.....	66
3.2.4 Comentários.....	67
3.2.5 Equipamento e Montagem.....	67
3.2.6 Reagentes.....	67
3.2.7 Procedimento.....	68
3.2.8 Cálculos.....	68
4 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS - VARIAÇÕES DE LABORATÓRIO.....	71
4.1 FÓSFORO.....	71
4.1.1 Experimento 1: Curva de Calibração/Determinação da faixa linear	71
4.1.2 Experimento 2: Viabilidade da amostra reagida.....	76
4.1.3 Experimento 3: Determinação de Limite de Detecção do Método e Verificação de Performance de Laboratório	79

4.1.4 Experimento 4: Verificação de Performance de Laboratório	80
4.1.5 Experimento 5: Análise da concentração do analito após digestão	82
4.1.6 Experimento 6: Variação na preservação das amostras.....	86
4.1.7 Experimento 7: Avaliação da recuperação do analito.....	87
4.2 CLOROFILA A.....	89
4.2.1 Experimento 8: Análise de amostra ambiental para a determinação de Clorofila a.....	89
4.2.2 Experimento 9: Análise do aspecto do espectrograma da Clorofila a..	92
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
5.1 Considerações a respeito do método.....	97
6 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

Na demanda pela geração da prova em procedimentos de perícias ambientais em processos de investigação criminal de eventos de poluição, surge como fundamental a determinação da autoria e da materialidade da conduta delituosa.

Neste sentido, existe a necessidade de se obter resultados quantitativos de parâmetros de qualidade, no caso deste estudo, das águas superficiais, de forma a relacioná-los com lançamentos de efluentes líquidos sobre os corpos d'água superficiais amostrados com o objetivo de investigar se tais lançamentos promovem o aumento das concentrações dos compostos de interesse e se tais contribuições resultam em dano ambiental naquele corpo d'água.

1.1 - Contexto Profissional

Este estudo optou pela investigação da qualidade da água superficial. A determinação da concentração de analitos em corpos d'água superficiais, exceto para os casos de certos analitos poluentes tóxicos tais como metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos, possui abordagem normalmente direcionada a aspectos de políticas públicas para a promoção de monitoramento da qualidade das águas em bacia hidrográficas, por exemplo. Contudo, para os trabalhos periciais, esta abordagem mostra-se adequada para o atendimento de demandas policiais e judiciais visto que, muitas vezes, o foco na determinação de responsabilidades visa a detecção do dano ambiental, normalmente difícil de ser determinado apenas pela investigação sobre a concentração de parâmetros dos próprios lançamentos poluentes, comparando-os com limites máximos da concentração de poluentes previstos nos documentos normativos em vigor na legislação brasileira.

Historicamente, a Polícia Federal, pelas atuações de seus Setores Técnico Científicos – SETEC's e, mais especificamente, pelos seus Grupos especializados em Perícias de Meio Ambiente têm, no atendimento das solicitações de perícias em locais de investigação de eventos de poluição, realizado procedimentos de coleta, preservação, preparação e análise baseados em normativos não consolidados os quais, não obstante sua eficácia e confiabilidade, não foram elaborados suficientemente e, sobretudo, adaptados sistematicamente à realidade do exame in loco e em laboratório nas diferentes situações e condições apresentadas aos Peritos Criminais no dia-a-dia de tais atendimentos.

O presente trabalho vem a sugerir, com base no desenvolvimento de metodologia científica baseada em estudo de quantificação por repetição e estimativa estatística do cálculo de erro, procedimentos que podem ser usados na determinação de concentrações de alguns analitos de interesse pericial na investigação de autoria e materialidade em eventos de poluição de corpos d'água superficiais.

Neste trabalho, serão investigadas as diferentes modalidades de coleta, preservação e análise na determinação da concentração do analito fósforo: Total e Dissolvido. Em apoio às investigações sobre o estado trófico do corpo d'água, propõe-se metodologia simplificada para a determinação de clorofila *a*. Tais parâmetros, fósforo e clorofila *a*, apesar de representarem pequena abrangência no escopo de investigação sobre as concentrações de compostos de interesse pericial, possuem interrelação com outras áreas científicas de interesse pericial tais como os estudos das distribuições das espécies de flora aquática e ripária e da população de organismos macroinvertebrados bentônicos. A utilização dos resultados de análises físico-químicas com outros parâmetros tais como os citados podem, ainda, serem relacionados para a determinação de índices de qualidade de água como mantenedora de vida aquática.

Escolha de Métodos: Oficiais x Não Oficiais

De forma a enquadrar os resultados como provas periciais aceitáveis, o corpo técnico pericial deve seguir metodologias oficiais quando as mesmas estão disponíveis. Alternativamente, podem ser adotadas metodologias consagradas, desenvolvidas por laboratórios e equipes as quais publicam tradicionalmente suas propostas metodológicas. Atualmente, no Brasil, observa-se a existência de diversas metodologias feitas para a determinação do mesmo analito. Tais metodologias são, geralmente, adaptadas de métodos existentes, normalmente aqueles publicados anteriormente no exterior, tais como aquelas propostas pela APHA - *American Public Health Association*, e pela USEPA - *United States Environmental Protection Agency*, editadas nos Estados Unidos e adotadas em diversos países. As metodologias nacionais relacionadas à análise química de águas superficiais são geralmente editadas por agências estaduais de meio ambiente tais como a CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, em São Paulo, pela empresa pública EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - e no âmbito de Projetos de Pesquisa desenvolvidos internamente em Instituições de Ensino. Ultimamente, a agência governamental ANA - Agência Nacional de Águas publicou um

Guia (ANA, 2013) contendo diretrizes sobre a coleta e preservação de amostras ambientais de águas superficiais, incluindo indicações sobre a preparação de reagentes, apresentando uma iniciativa que pode levar a uma padronização que incluiria metodologias na determinação de íons inorgânicos e outros parâmetros de qualidade de água em âmbito nacional.

Elaboração de Índices a constar em laudos periciais: Índice de Estado Trófico - IET

O Índice do Estado Trófico - IET - tem por finalidade classificar corpos d'água em diferentes graus de trofia, ou seja, avalia a qualidade da água quanto ao enriquecimento por nutrientes e seu efeito relacionado ao crescimento excessivo das algas ou ao aumento da infestação de macrófitas aquáticas (CETESB, 2011). O índice IET é função de dois indicadores: a clorofila *a* e o fósforo total. A clorofila *a* indica diretamente o resultado do processo de eutrofização do corpo d'água e a ausência de fósforo indica a limitação de um nutriente de algas aquáticas, sendo sua presença muitas vezes diretamente relacionada com um ambiente propício à proliferação destas algas.

Em última análise, operacionalmente, nos eventos periciais de campo, para a estimativa do IET nas águas superficiais, objetiva-se obter, no mínimo, os dados em formato na Tabela 1.

ponto	coord. x	coord. y	P total	Clorofila
1				
2				
...				

Tabela 1: Exemplo de formato de tabela para dados de campo e resultados de análises.

Complementarmente, inclui-se, como condições de campo, as leituras de condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, pH e temperatura dos corpos d'água nos locais de coleta das amostras.

1.2 Discussão sobre o equipamento

Espectrofotometria para a determinação de Fósforo e Clorofila 'a' na Polícia Federal

No ano de 2007, foi celebrado um acordo conhecido como PROMOTEC - Programa de Modernização Tecnológica, elaborado pela SENASP/MJ, o qual teve o objetivo de aparelhar as instâncias técnico científicas periciais associadas principalmente à Polícia Federal. Na ocasião, foram adquiridos Espectrofotômetros com sensores na faixa do Ultra-Violeta e do espectro visível, ditos UV-Vis. Foi escolhido o modelo 8453 da fabricante Agilent. Tais equipamentos, equipados com Detector em Matriz de Diodos (DAD) possuem a capacidade de analisar por espectrofotometria analitos que possuem absorbância entre os comprimentos de onda de 190 a 1100 nm, produzindo um perfil de absorbância, ou espectrograma, por todo o espectro em uma mesma leitura. Tal característica é vantajosa em relação aos equipamentos que realizam a leitura da absorbância de apenas um comprimento de onda, pois permite a visualização do perfil de absorbância nas faixas espectrais próximas ao comprimento de onda desejado, tornando a análise mais intuitiva, principalmente quanto à presença de compostos interferentes.

Como acessório do Espectrofotômetro UV-Vis, foram também fornecidos sistemas de célula de fluxo, os quais contêm bomba peristáltica, tubulações e cubetas de fluxo. Estes sistemas possuem grande versatilidade de operação por possuírem a capacidade de se introduzir uma diferente amostra para análise sem haver a necessidade de se retirar a cubetas, evitando um procedimento que produz uma importante fonte de incerteza de resultados.

Especificações Ópticas do Espectrofotômetro UV-Vis 8453	
Faixa de Comprimento de Onda	190-1100nm
Abertura da fenda	1nm
Resolução Espectral	1.6nm
Acurácia de Comprimento de Onda	+/- 0,5 nm
Acurácia Fotométrica	+/- 0,01 UA
Ruído	<0,0002 UA
Linha de Base	<0,001 UA

Tabela 2: Especificações Ópticas do Espectrofotômetro Agilent UV-Vis modelo 8453 (Agilent, 2013).

As cubetas de fluxo possuem caminho óptico de 10mm e são feitas de quartzo, aumentando a banda de frequência ou comprimentos de onda úteis nos ensaios.

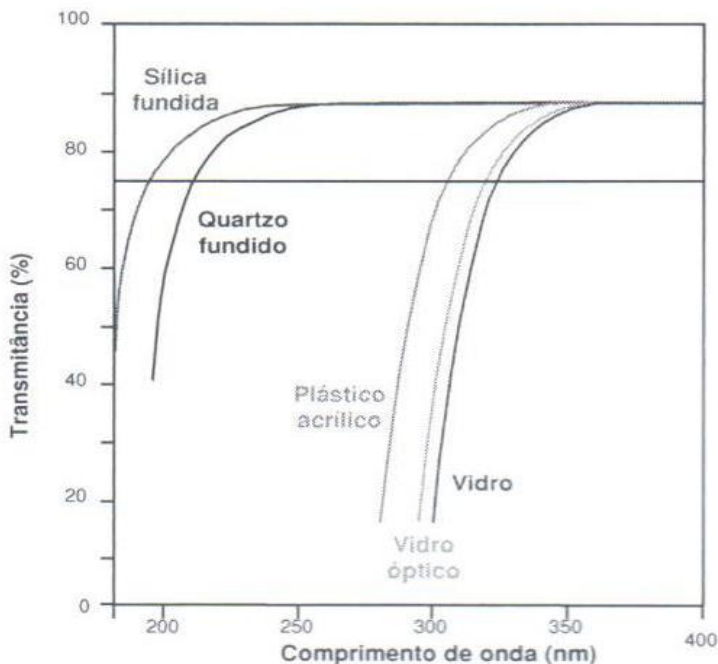


Figura 1: Gráfico da Transmitância em função do Comprimento de Onda na faixa do espectro Ultra-Violeta de cubetas em diferentes materiais. Fonte: Agilent, 2013.

As metodologias de ensaio para a determinação da concentração de fósforo neste trabalho prevêm o solvente utilizado sendo água destilada, o qual permite leituras no comprimento de onda escolhido de 880nm. Para clorofila *a*, o solvente é a acetona a qual, embora apresentando banda de frequências mais restritiva, permite leituras sem interferências do solvente nos comprimentos de onda escolhidos, na faixa entre 660 a 670nm.

Solvente	Comprimento de Onda [nm]
Acetonitrila	180-195
Ácido Sulfúrico 95%	
Água	
n-Hexano	
Metanol	
Ciclopentano	200-210
Glicerol	
Etanol 95%	
Cicloexano	
Isopropanol	
Éter Etílico	210-220
Álcool Butílico	
1,4-Dioxano	
Clorofórmio	
Metil-Formato	
Etil-Acetato	245-260
Ácido Acético	
Tetracloroeto de Carbono	
Dimetil Sulfóxido	
Benzeno	
Tolueno	265-275
m-Xileno	
Piridina	
Acetona	
Disulfito de Carbono	
	280-290
	acima de 300

Tabela 3: Comprimento de onda de cut-off de solventes. O comprimento de onda de cut-off corresponde ao qual a transmitância através de um caminho óptico de 10mm é < 25%. (Agilent, 2003, 2013).

Sendo assim, por tratar-se de equipamento padrão de espectroscopia dos Setores Técnico Científicos da Polícia Federal nos Estados, foi utilizado o Espectrofotômetro UV-Vis com matriz de diodos neste trabalho para a determinação das concentrações de fósforo e clorofila, sendo a metodologia proposta baseada na operação destes equipamentos com célula de fluxo.

O modelamento da determinação da concentração de analito em solução por métodos espectrofotométricos vem da derivação da lei de Lambert-Beer pela fórmula:

$$A = a \cdot b \cdot c \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

- A = Absorbância, em UA;
- a = absorptividade, em L/(g.cm), equivalente à $\frac{\epsilon}{M}$, onde ϵ é o coeficiente de extinção molar ou absorptividade molar e M é a massa molar do analito;
- b = caminho óptico, em cm;
- c = concentração do analito, em g L⁻¹;

O coeficiente de absorptividade molar, ϵ , é característico de uma dada substância sob um conjunto determinado de condições, tais como temperatura, solvente, comprimento de onda e é influenciado pelas características do instrumento utilizado. Por estas razões, valores pré-determinados de ϵ não são utilizados em análises quantitativas, preferindo-se à confecção de curvas de calibração para a substância sendo analisada. O valor da constante a pode ser considerado como a inclinação da curva de calibração após regressão da faixa linear de resposta do sensor, ou seja, uma relação linear entre a absorbância lida e a concentração do soluto.

As técnicas alternativas de detecção empregam, no caso do Ortofosfato, a Cromatografia Iônica e a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho - HPLC. No primeiro caso, a detecção aplica-se apenas à fração dissolvida do íon ortofosfato.

Atualmente, a técnica da Espectrofotometria oferece equipamentos auxiliares que podem produzir aumento de eficiência e produtividade nas análises, tais como amostradores automáticos e condutores em fibra ótica para a análise que dispensa o uso de cubetas, permitindo que o sensor seja introduzido diretamente no frasco ou mesmo no próprio corpo d'água.

Para a análise da cinética das reações envolvidas na preservação e preparação das amostras, há disponível no mercado software específico o qual, ao controlar a abertura do diafragma (*shutter*) e a bomba peristáltica de alimentação, e associado a um equipamento de amostragem automática tipo XY, tem o potencial de produzir resultados que podem ser analisados qualitativamente e estatisticamente. Tais resultados são fundamentais no desenvolvimento de métodos os quais, após verificados quanto ao seu desempenho e qualidade, poderão ser adotados de forma robusta nas rotinas de análises dos Setores Técnico Científicos periciais.

Neste trabalho, foram abordados os procedimentos de análise por espectrofotometria de dois analitos, o ortofosfato, íon inorgânico para a determinação do teor de Fósforo Total, no comprimento de onda de 880nm, e a clorofila *a*, molécula orgânica, no comprimento de onda 665nm. Abaixo segue tabela com a faixa de comprimentos de onda de cores visíveis.

Comprimento de Onda, λ [nm]	Cor	Cor Complementar
< 400	Ultravioleta	-
400 - 435	Violeta	Verde amarelado
435 - 480	Azul	Amarelo
480 - 490	Azul esverdeado	Alaranjado
490 - 500	Verde azulado	Vermelho
500 - 560	Verde	Púrpura
560 - 580	Verde amarelado	Violeta
580 - 595	Amarelado	Azul
595 - 650	Alaranjado	Azul esverdeado
650 - 750	Vermelho	Verde azulado
> 750	Infravermelho	-

Tabela 4: Faixa de comprimentos de onda das diferentes cores e respectivas cores intermediárias (cor visível da amostra) (Ohlweiler, 1981, citado em Lana, 2008)

1.3 Analito FÓSFORO

O fósforo é um elemento não metálico, essencial à vida e importante macronutriente de plantas e fitoplâncton. É naturalmente biodisponível na natureza em concentrações baixas, com fonte em rochas e em dejetos orgânicos sólidos e líquidos. Geralmente, juntamente com o nitrogênio em certos casos, é material limitante na proliferação de fitoplâncton em águas naturais.

O fósforo pode ser também proveniente de fontes antropogênicas, que contribui para o aumento da concentração em águas superficiais advindo de escoamento de esgotamento sanitário, águas residuárias contendo fertilizantes e detergentes à base de fosfato.

Compostos mais utilizados na indústria	Uso
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O CaHPO ₄ ·2H ₂ O H ₃ PO ₄ PCl ₃ POCl ₃ P ₄ S ₁₀ Na ₅ P ₃ O ₁₀	Fermento em pó e fertilizantes Aditivo em nutrição animal. Produção de fertilizantes fosfatados. Produção de POCl ₃ e pesticidas. Produção de materiais plastificantes. Produção de aditivos e pesticidas. Detergentes.

Tabela 5: Exemplo de usos industriais de compostos contendo fósforo.

O monitoramento do fósforo tem importância ambiental por tratar-se, frequentemente, de elemento limitante à proliferação de algas em águas superficiais, está associado aos eventos de eutrofização de corpos d'água. O fenômeno de eutrofização de águas superficiais causa danos relevantes à fauna e flora aquáticas, principalmente pela depleção de oxigênio dissolvido pelo seu consumo por zooplâncton e pela opacidade da coluna d'água que impede a realização de fotossíntese de algas bentônicas mais profundas (Wilson, 2013).

Atualmente, o monitoramento de fósforo na água tem sido considerado como de maior relevância nas políticas públicas as quais tratam da qualidade da água como mantenedora de vida e para fins de abastecimento público (Marotta et al., 2008).

Nos trabalhos de campo da Perícia, são primordialmente determinados sistematicamente ao longo dos leitos nos casos envolvendo poluição de corpos d'água superficiais receptores de efluentes contendo carga orgânica.

Espécies de fósforo em água

Em análise colorimétrica por espectrofotometria, o complexo colorido indicador, de cor azul, desenvolve-se a partir do teor de fósforo apenas na forma de ortofosfato - PO₄⁻³. Assim, deve-se proceder a um processo de digestão das amostras aquosas para que as outras espécies fracionadas de fósforo sejam complexadas em ortofosfato e possam ser identificadas no instrumento. As frações mais importantes de fósforo nas amostras são as seguintes:

Fósforo Total (PT) - todo o conteúdo de fósforo na amostra em todas as formas, resultante da análise da amostra após a digestão por persulfato.

Ortofosfato Total (P-orto) - fósforo inorgânico [PO_4^{-3}] na amostra por análise colorimétrica direta. Também chamado de fósforo reativo.

Fósforo Total Hidrolisável (P-hidro) - fósforo contido na amostra medido após procedimento de hidrólise por ácido sulfúrico, decrescido no resultado de P-orto. A fração hidrolisável inclui os polifosfatos (P_2O_7 , P_3O_{10} , etc) acrescida de alguma fração orgânica.

Fósforo Orgânico Total - fósforo inorgânico e orgânico oxidável na amostra após digestão por persulfato, decrescido do Fósforo Hidrolisável e do Ortofosfato.

Fósforo Dissolvido - todo o conteúdo de fósforo no filtrado de amostra após filtração em filtro livre de fósforo de poro em $0,45\ \mu\text{m}$ e analisado após digestão por persulfato.

Ortofosfato Dissolvido - contido no filtrado após ensaio colorimétrico.

Fósforo Dissolvido Hidrolisável - contido no filtrado e medido após a hidrolisação por solução de ácido sulfúrico, decrescido do ortofosfato dissolvido.

Fósforo Orgânico Dissolvido - medido após a digestão por persulfato, decrescido do ortofosfato e fosfato hidrolisável dissolvidos.

Interferências

Baixas concentrações de cobre, ferro e silicatos não causam interferência nos resultados do método. Entretanto, altas concentrações podem causar precipitação, e consequente diminuição dos valores de fósforo.

Arsenatos podem interferir nos resultados quando em concentrações maiores que o fosfato.

Quanto à turbidez, amostras para a determinação de ortofosfato devem ser filtradas por passagem através de chumaço de algodão antes da análise. As amostras para a determinação de fósforo hidrolisável e orgânico devem ser filtradas apenas após a digestão por persulfato. Amostras com cor absorvidas em comprimentos de onda próximos ao utilizado no método podem interferir nos resultados.

Algumas interferências causadas dentro do método podem ser causadas por contaminantes presentes na água de laboratório, reagentes, vidrarias e outros equipamentos.

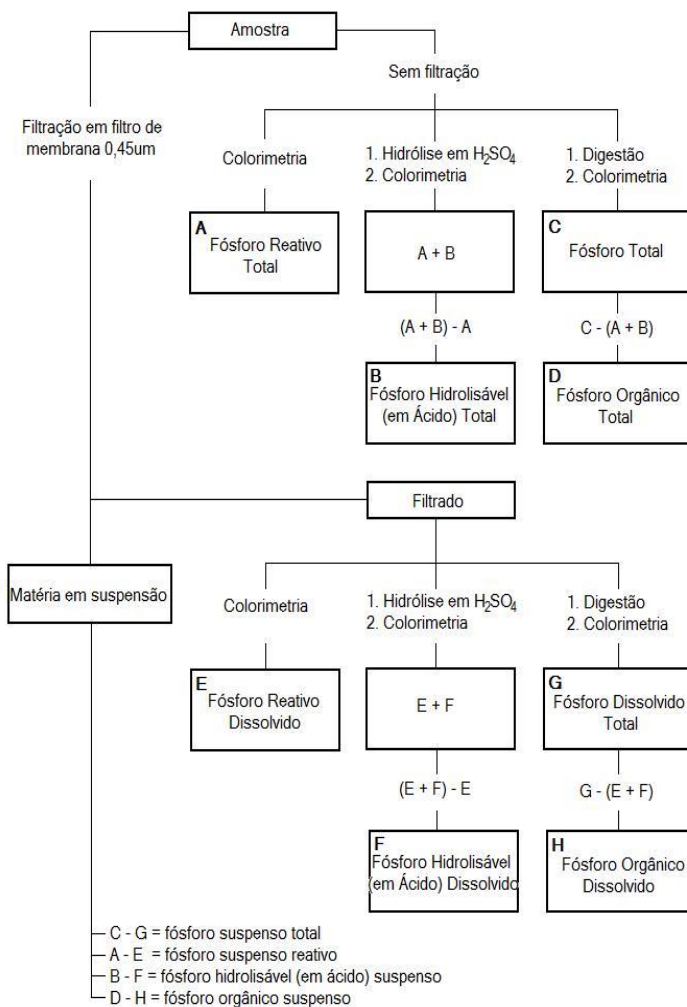
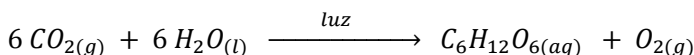


Figura 2: Diagrama das diferentes espécies de fósforo em solução aquosa. (APHA/SM, 2012, traduzido)

1.4 Analito CLOROFILA A

A clorofila é uma molécula orgânica presente em vegetais (organismos eucariontes) e algas cianofíceas (organismos procariontes) a qual contém um íon metálico em sua estrutura, sendo classificada como uma molécula metalorgânica. A clorofila é responsável pela cor verde dos vegetais. Sua estrutura consiste em um anel porfirínico modificado, ligado a um íon de magnésio $Mg(II)$ e a um grupo hidrocarbônico lateral, o fitol.

A molécula de clorofila é excitada pela luz solar tornando-se um receptor de energia para as plantas, decompondo a água e utilizando nutrientes para a produção de oxigênio e trifosfato de adenosina, ATP. Pelo processo de fotossíntese, o ATP é utilizado na síntese de carboidrato utilizando como reagente o dióxido de carbono, CO_2 , em reação assim descrita:



A clorofila absorve muito bem a luz visível na faixa espectral correspondente às cores vermelha, laranja, azul e violeta, mas reflete grande parte da cor verde, resultando na coloração verde das plantas.

No processo de cozimento de alimentos vegetais e pelo processo de degradação natural dos vegetais por exposição à luz solar, o íon metálico $Mg(II)$ é substituído por dois íons H^+ provenientes de ácidos liberados nestes processos, causando a degradação da clorofila em substância conhecida por feofitina, a qual possui cor verde amarelada, típica de vegetais em degradação.

A clorofila é importante indicador de qualidade de água, visto que sua concentração aumenta em episódios de proliferação de algas em fenômenos conhecidos como eutrofização de corpos d'água. A eutrofização pode causar efeitos bastante deletérios à vida aquática, visto que uma proliferação de algas leva a um consequente aumento de zooplâncton consumidor de oxigênio dissolvido, acarretando a depleção de oxigênio na água e podendo levar à morte organismos aquáticos.

A determinação da concentração de clorofila em amostras de águas superficiais é preferencialmente realizada por ensaios espectrofotométricos, onde se determina a concentração do tipo 'a' da clorofila. A extração da clorofila, presente no interior das células cloroplastos, se dá com o uso de sonicação do extrato do filtro em acetona, visto que a clorofila tem baixa solubilidade em água. Este

indicador compõe, juntamente com o teor de fósforo, índice de qualidade de água conhecido como Índice de Estado Trófico, ou IET, de corpos d'água superficiais.

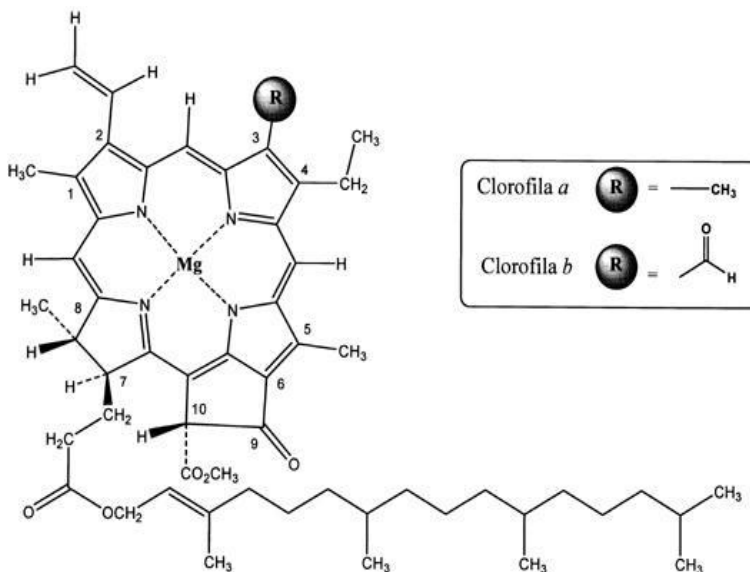


Figura 3: Estrutura das clorofilas a e b. (Streit et ali, 2005)

1.5 Legislação sobre o tema

Os valores de concentração de fósforo e clorofila *a* em águas superficiais recebem apreciação pela legislação brasileira abordagem primordialmente relacionada ao estado trófico de corpos d'água, sendo suas concentrações limites definidas apenas para fins de classificação de corpos d'água (com definição na Resolução CONAMA n°357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e foi complementada pela Resolução CONAMA n°430/2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes).

A legislação brasileira, desta forma, regula a concentração dos indicadores apenas para fins de classificação de corpos d'água, e não

prevê a indicação de limite de concentração de fósforo para lançamentos poluidores.

Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas doces (salinidade < 0,5‰) - Enquadramento/Lançamento*						
Indicador	classe especial	classe 1	classe 2	classe 3	classe 4	Lançamento
P total - amb. lântico	**	0,020	0,030	0,050	***	***
P total - amb. intermediário	**	0,025	0,050	0,075	***	***
P total - amb. lótico	**	0,100	0,100	0,150	***	***
Clorofila <i>a</i>	**	0,010	0,030	0,060	***	***

Tabela 6: Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas doces (salinidade < 0,5‰) - Enquadramento/Lançamento

* conforme Resolução CONAMA n°357/2005 no CAPITULO III - DAS CONDICÕES E PADRÕES DE QUALIDADE DAS ÁGUAS, Seção II, para águas doces: salinidade < 0,5‰.

** condições naturais. Vedado o lançamento de poluentes.

*** não há limites definidos.

Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas salobras (salinidade entre 0,5‰ e 30‰) - Enquadramento/Lançamento*					
Indicador	classe especial	classe 1	classe 2	classe 3	Lançamento
P total	**	0,124	0,186	***	***
Polifosfat os ^a	**	0,062	0,093	***	***
Clorofila <i>a</i>	***	***	***	***	***

Tabela 7: Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas salobras (salinidade entre 0,5‰ e 30‰) - Enquadramento/Lançamento

* conforme Resolução CONAMA n°357/2005 no CAPITULO III - DAS CONDICÕES E PADRÕES DE QUALIDADE DAS ÁGUAS, Seção IV, para águas salobras: salinidade entre 0,5‰ e 30

** condições naturais. Vedado o lançamento de poluentes.

*** não há limites definidos.

a) determinado pela diferença entre fósforo ácido hidrolisável total e fósforo reativo (ortofosfato) total.

Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas salinas (salinidade acima de 30‰) - Enquadramento/Lançamento*					
Indicador	classe especial	classe 1	classe 2	classe 3	Lançamento
P total	**	0,062	0,093	***	***
Polifosfatos ^a	**	0,031	0,0465	***	***
Clorofila <i>a</i>	***	***	***	***	***

Tabela 8: Limites de concentração (padrões) em corpos d'água - águas salinas (salinidade acima de 30‰) - Enquadramento/Lançamento

* conforme Resolução CONAMA n°357/2005 no CAPITULO III - DAS CONDICÕES E PADRÕES DE QUALIDADE DAS ÁGUAS, Seção III, para águas salinas: salinidade acima de 30‰.

** condições naturais. Vedado o lançamento de poluentes.

*** não há limites definidos.

a) determinado pela diferença entre o resultado de concentração de fósforo após hidrólise ácida e fósforo reativo (ortofosfato) total.

O parâmetro clorofila *a* não está definido nas regulamentações sobre lançamentos poluidores devido ao fato que o aumento de sua concentração está relacionado ao aumento dos nutrientes, cujas concentrações são regulamentadas em Lei nos corpos d'água. [conforme tabelas 6 a 8]

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste estudo foi analisar os resultados de ensaios de laboratório de concentrações de analitos em águas superficiais de corpos d'água sob influência de lançamentos de efluentes poluidores com relação a uma variação nos procedimentos de coleta, preservação e análise laboratorial de forma a adequar procedimentos de exames periciais adequados para o cenário atual da perícia criminal federal em locais de investigação de crimes ambientais por poluição.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram definidos como:

- Propor metodologia de procedimentos de coleta, preservação e análise de amostras de água superficial para a determinação das concentrações de fósforo Total e clorofila *a*.
- Investigar a influência de variações de tempo e temperatura até a preparação e ensaio em laboratório em amostras de águas superficiais coletadas para a determinação da concentração de fósforo.
- Investigar a estabilidade dos resultados obtidos na determinação da concentração de fósforo em amostras preparadas após a introdução em laboratório do reagente combinado.
- Investigar a influência do tempo de preservação sobre a determinação da concentração de clorofila *a* em amostras de águas superficiais.

3 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS DE INTERESSE (METODOLOGIA)

3.1 Proposta de Método para a Determinação de FÓSFORO em amostra de água¹

3.1.1 Escopo e Aplicação

Este método abrange a determinação de espécies de fósforo em água potável, subterrânea e superficial, e de efluentes domésticos e industriais.

A metodologia está baseada nas reações que são específicas para a o íon ortofosfato. Assim, a determinação das diferentes espécies, definidas na sub-seção 1.3, dependerá do pré-tratamento da amostra.

Exceto os casos de estudos mais aprofundados, as formas de fósforo mais comumente determinadas são o fósforo total e dissolvido; e o ortofosfato total e dissolvido. fósforo hidrolisável é normalmente encontrado apenas em amostras de esgotos. Formas insolúveis são determinadas por cálculo indireto.

3.1.2 Sumário do Método

O molibdato de amônio é reagido em meio ácido com soluções que contêm pequenas concentrações de fósforo, catalisado por uma solução de tartarato de antimônio e potássio para formar um composto de fosfomolibdato de amônio (CAS n° 12026-66-3). O composto é reduzido por ácido ascórbico para formar complexo em cor azul intenso. A intensidade da cor é proporcional à concentração de fósforo na amostra.

O composto azul é formado pela presença de ortofosfato. Outras espécies de fosfato como os polifosfatos podem ser convertidos a ortofosfato pela hidrólise com ácido sulfúrico. O fosfato orgânico pode ser convertido em ortofosfato por digestão com persulfato.

¹ adaptação direta da publicação "METHOD 365.1 - DETERMINATION OS PHOSPHORUS BY SEMI-AUTOMATED COLORIMETRY", revisão 2.0, editado pelo Office of Research and Development da US-EPA em Cincinnati, Ohio, em 1993, em linguagem expositiva, contendo detalhamento de procedimentos.

3.1.3 Definições

Padrão de Calibração (PC) - uma solução preparada a partir da diluição da solução padrão ou de estoque, utilizada para gerar a curva de calibração e calibrar o instrumento quanto à detecção do analito.

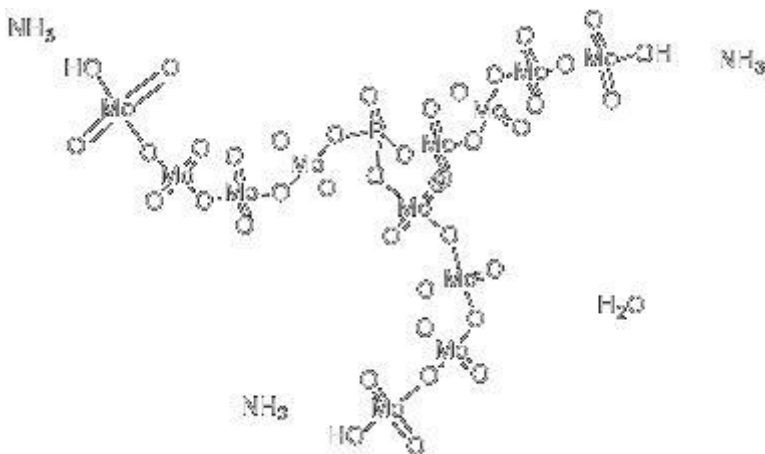
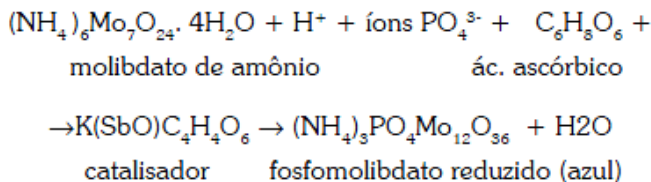


Figura 4: Representação da molécula de fosfomolibdato de amônio (CAS nº 12026-66-3).

Solução de Verificação de Performance (SVP) - uma solução de um ou mais analitos de concentração conhecida, determinados por diferentes métodos, utilizada para a verificação da performance do instrumento.

Branco de Laboratório Fortificado (BLF) - uma alíquota de água de laboratório adicionada de quantidade conhecida do analito de interesse e analisada como uma amostra. Tem utilização na verificação da recuperação (controle) do método na determinação da concentração

do analito. Deve ser preferencialmente preparado com a mesma concentração dos padrões de calibração (PC's).

Amostra Fortificada (AF) - uma alíquota de uma amostra ambiental adicionada de quantidade conhecida do analito de interesse e analisada no método. Tem a função de indicar a contribuição em abundância do sinal do instrumento proporcional à adição em concentração do analito. A análise da AF deve ser realizada em paralelo à análise de uma alíquota da mesma amostra não fortificada, para a correção de background.

Branco de Laboratório (BL) - uma alíquota da água de laboratório utilizada como reagente reagida no método exatamente como uma amostra, de forma a determinar a influência da exposição dos reagentes à vidraria, solventes, frascos de armazenamento e à qualidade da própria água de laboratório nos resultados do método. É utilizado para determinar se o analito do método e os interferentes estão presentes no ambiente de laboratório, nos reagentes e nos equipamentos. Para a análise de Ortofosfato (PO_4), pode ser utilizado como Branco de Calibração.

Branco de Calibração de Amostras (BCA) - um volume amostra reagido com uma variação incompleta dos mesmos reagentes, o Reagente Combinado para Branco (sub-seção 3.1.5) que seriam recebidos pelas amostras ambientais, para a correção de background de cor natural da amostra.

Faixa de Calibração Linear (FCL) - é a faixa de calibração onde a resposta do instrumento é linear.

Folha de Dados de Segurança do Material (FDSM) - informação provida pelo fabricante contendo dados sobre as propriedades físicas, toxicidade, perigos à saúde, armazenamento, manipulação, intervenções no caso de derramamentos do produto químico.

Limite de Detecção do Método (LDM) - a concentração mínima de um analito que pode ser identificada, mensurada e apresentada com uma confiança de 99% que a concentração é maior que zero.

Amostra de Controle de Qualidade (ACQ) - uma solução do analito do método de concentração conhecida utilizada para fortificar uma alíquota do BL. Deve ser obtido de fontes externas ao laboratório que não utilizam o mesmo fornecedor. É utilizada para checar a performance do laboratório com materiais de teste preparados externamente.

Solução Padrão de Estoque (SPE) - solução concentrada contendo um ou mais analitos do método preparada em laboratório utilizando materiais de referência ou adquiridas de fontes comerciais confiáveis.

3.1.4. Equipamentos, Suprimentos e Montagens

- Instalações: pia com água corrente, bancada (para pia, preparação de reagentes e amostras e para os instrumentos), destilador de água com tanques de armazenagem, geladeira, capela para a exaustão de gases, terminal de computador.
- Insumos: ponteiras para micropipetador de 5,0 mL, termômetro, fita crepe 5 cm de largura, pipetas Pasteur 3,0 mL, vidro de relógio, funil, espátula em aço inox, material de rotulagem (etiquetas, canetas marcadoras, tesoura), balde em PEAD de 15 litros, equipamento de EPI (óculos e luvas nitrílicas), fitas de pH, papel absorvente, pissetas de 1 litro.
- Medidor portátil para análise de água, marca Instrutherm, com funções para medição de Condutividade, pH, Temperatura e Oxigênio Dissolvido, acompanhado de sondas, capacidade de registro de 100 leituras, com saída serial RS-232.
- Balança de Precisão
- Geradores de vortex.
- 02 (dois) Micropipetadores monocal, de precisão, faixa de volume 0,1 a 5 mL, com suporte.
- Vidraria (quantidade total utilizada no estudo):
 - 16 balões volumétricos de 50 mL.
 - 16 erlenmeyers 125 mL.
 - 16 copos béquer de 100 mL.
 - 60 tubos de ensaios de 27 mL, com suporte 12x5.
 - 60 tubos de ensaio de 15mL, com suporte.
 - frascos de vidro para descarte de soluções.
 - 04 copos béquer de 250 mL.
 - 01 copo béquer de 5 L, sem graduação (para a lavagem aquecida das vidrarias).
 - 01 pipeta volumétrica de 50 mL.
 - 01 pipeta volumétrica de 10 mL.

Preparação da vidraria: toda a vidraria envolvida na preparação das amostras foi lavada e escovada e colocadas em solução aquecida a 70°C de ácido clorídrico HCl 1:3 v/v, sendo posteriormente esfregadas com bucha plástica sob água destilada,

enxaguadas e colocadas para secar sobre papel toalha. As vidrarias após uso foram imediatamente esfregadas sob água de torneira e mantidas submersas em solução ácida de HCl 1:8, sendo posteriormente enxaguadas em água destilada antes do próximo uso.

- Placa de Aquecimento, marca FANEM, dimensões 40 cm x 40 cm.
- Bomba Peristáltica marca Agilent, modelo PS-1 para uso acoplada a Espectrofotômetro, acompanhada de tubulações próprias para uso com células de fluxo.
- Espectrofotômetro marca Agilent modelo 8453 com configuração para uso com célula de fluxo.
- Célula (ou Cubeta) de Fluxo, em quartzo fundido, volume 80 µL, caminho ótico de 10mm, marca Agilent.
- Software ChemStation, versão 1115G, de controle e gerenciamento do Espectrofotômetro Agilent 8453, com módulo básico de controle de fluxo e gravação de dados.

3.1.5. Reagentes e Padrões

- Água Reagente de Laboratório - água destilada, livre de fósforo.
- Solução de Ácido Sulfúrico, 5 mol L⁻¹ - Adicionar aos poucos 70 mL de H₂SO₄ conc. em aproximadamente 400 mL de água de laboratório. Esfriar até a temperatura ambiente e completar com água até 500 mL.
- Solução de Tartarato de Antimônio e Potássio - Pesar 1,3715 g de K(SbO)C₄H₄O₆ · ½ H₂O e dissolver em 400 mL de água destilada em um frasco volumétrico de 500 mL e diluir até o volume. Armazenar a 4 °C em frasco de vidro com tampa esmerilhada.
- Solução de Molibdato de Amônio - Dissolver 4 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O em 100 mL de água destilada. Armazenar em frasco plástico à 4 °C.
- Ácido Ascórbico, 0,1 mol L⁻¹ - Dissolver 1,76 g de ácido ascórbico em 100 mL de água destilada. A solução é estável por aproximadamente uma semana se preparada com água virtualmente isenta de metais pesados e armazenada a 4°C.

- Reagente Combinado - misturar os reagentes acima nas proporções para a preparação de 100 mL da solução: 50 mL de H_2SO_4 5,0 mol L^{-1} , 5 mL da Solução de Tartarato de Antimônio e Potássio, 15 mL da Solução de Molibdato de Amônio e 30 mL da Solução de Ácido Ascórbico. Misturar nesta ordem, promovendo agitação após cada adição. Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente. Deve desenvolver cor amarelo claro. Se turbidez se formar no reagente combinado, agitar e deixar descansar até desaparecer. Esta solução é estável por aproximadamente 4 horas. Para armazenamento temporário, uma solução estável pode ser preparada ao não incluir o ácido ascórbico no reagente combinado.
- Reagente Combinado para Branco de Amostra com Cor - misturar os reagentes nas proporções, agitando entre as misturas e seguindo a ordem: 35 mL de água destilada, 50 mL de Solução de H_2SO_4 5,0 mol L^{-1} e 15 mL de Solução de Molibdato de Amônio. Deve ser trocada a cada ano. Utilizada na reação de água reagente para a determinação de branco para amostras ambientais que apresentam cor.
- Solução de Ácido Sulfúrico, 11 mol L^{-1} - lentamente adicionar 155 mL de H_2SO_4 conc. em 300 mL de água destilada. Resfriar e completar até 500 mL.
- Persulfato de Potássio, $\text{P}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (CAS n°7727-54-0)
- Água de Lavagem Ácida - adicionar 40 mL de solução de H_2SO_4 5,0 mol L^{-1} em 1 litro de água e diluir até 2 litros. (Não utilizar se apenas o ortofosfato for determinado). Utilizada alternativamente para a lavagem da cubeta entre leituras.
- Solução de Indicador de Fenolftaleína (5 g/L) - dissolver 0,5g de fenolftaleína em solução de 50 mL de álcool isopropílico e 50 mL de água destilada.
- Solução de Estoque/Padrão de fósforo - dissolver 43,93 mg de fosfato de potássio monobásico pré-seco (1 hora a 105°C) KH_2PO_4 em água destilada e diluir até 1000 mL. 1,0 mL = 10,0 mg P.

- Solução Padrão de fósforo - Diluir 100 mL da solução de estoque até 1000 mL com água destilada. 1,0 mL = 1,0 mg P.

Solução	massa ou volume	vol. final	frasco	temp. de estoque.	tempo de estoque
Água Destilada	-	1000 mL	pisseta plást.	t.amb.	indef.
Ácido Sulfúrico 5N	70 mL	500 mL	vidro, 500 mL	t.amb.	3 anos
Tartarato de Sb e K	1,3715 g	500 mL	vidro, 500 mL	t.amb.	2 anos
Molibdato de Amônio	20 g	500 mL	vidro, 500 mL	t.amb.	2 anos
Ácido Ascórbico, 0,1M	1,76 g	100 mL	vidro, 250 mL	4°C	7 dias
Ácido Sulfúrico 11N	155 mL	500 mL	vidro, 500 mL	t.amb.	3 anos
Fenolftaleína, 5g/l	0,5 g	100 mL	vidro, 150 mL	t.amb.	2 anos
Di-hidro-fosfato de Potássio	43,93 mg	1000 mL	vidro, 1000 mL	t.amb.	2 anos

Tabela 9: tipos de armazenamentos e preservação dos reagentes para a determinação de fósforo.

3.1.6. Coleta, Preservação e Armazenamento da Amostra

Foram utilizados neste trabalho frascos de 1000 mL de Polietileno de Alta Densidade - PEAD, branco leitoso fosco, com tampa de rosca e batoque, um para cada modalidade de análise: para Ortofosfato e para Fósforo Total. O volume do frasco permite a realização de replicatas e de ensaios com amostras fortificadas a partir da mesma amostra coletada, visto que o volume da alíquota de amostra padrão é de 50 mL, sendo o volume total de amostra consumido na

análise igual a 300 mL. Todos os frascos foram lavados em solução diluída de HCl e enxaguados com água destilada.

Todas as amostras ambientais foram preservadas com H_2SO_4 concentrado em $\text{pH} < 2$ e resfriadas até $4\text{ }^\circ\text{C}$ logo após a coleta e transportadas protegidas da luz solar, exceto aquelas destinadas às análises de Ortofosfato PO_4^{-3} reativo (dissolvido), às quais não foram pré-acidificadas.

As amostras não acidificadas devem ser analisadas assim que possível após a coleta. Se o armazenamento for necessário, amostras acidificadas preservadas devem ser resfriadas até $4\text{ }^\circ\text{C}$, podendo ser mantidas por até 28 dias.

Todos os frascos devem ser identificados quanto ao local e conter dados sobre a data e hora da coleta, temperatura da água, pH, condutividade, profundidade de coleta, analito de interesse, informações sobre a preservação da amostra e nome do operador.

3.1.7 Avaliação da Performance de Laboratório

Demonstração Inicial de Performance

A demonstração inicial de performance é usada para caracterizar a performance do instrumento pela:

- a) determinação da Faixa Linear de Calibração, FLC;
- b) Verificação da Performance do Instrumento (VPI);

e da performance do método pela:

- c) determinação do Limite de Detecção do Método, LDM;
- d) avaliação da Recuperação do Analito, R% (para amostras ambientais),
antes de proceder às análises pelo método.

Determinação da Faixa Linear de Calibração, FLC

A Faixa Linear de Calibração (FLC) - A FLC deve ser determinada inicialmente e verificada a cada seis meses ou quando uma mudança inesperada nos resultados aconteça. A demonstração de linearidade deve utilizar padrões suficientes para a linearidade da curva. A verificação deve utilizar no mínimo um branco e três padrões. Variações acima de 10% devem ser investigados.

Verificação da Performance do Instrumento, VPI

Solução de Verificação de Performance do Instrumento (SVPI) - para todas as determinações, o laboratório deve analisar a SVPI (uma solução com concentração no meio da faixa) e proceder a uma análise de branco logo após os procedimentos de calibração, a cada dez amostras e ao final de cada série de análises. Tais análises servem para a verificação se a resposta do instrumento está na faixa de $\pm 10\%$ da calibração. Se houver disparidades nos resultados, deve ser feita uma verificação da SVPI. Se as respostas continuarem fora da faixa de 10% da calibração, a análise das amostras deve ser descontinuada e as ações de reparação devem ser postas em prática. Os dados de SVPI devem ser mantidos em registro para posterior avaliação.

Genericamente, para a Verificação de Performance, o Espectrofotômetro Agilent modelo 8453 utilizado neste Trabalho utiliza uma solução de Cafeína a 5% como Solução tipo SVPI.

Determinação do Limite de Detecção do Método, LDM

Limite de Detecção do Método (LDM) - o LDM deve ser estabelecido para todos os analitos utilizando-se brancos fortificados com concentrações de duas a três vezes o limite de detecção do instrumento. Para determinar o valor do LDM, analisar sete alíquotas replicatas de Branco de Laboratório Fortificado (BLF) pelo método. Com o resultado, fazer todos os cálculos previstos e definir os valores de concentração nas unidades apropriadas. Calcular então o LDM como se segue:

$$\text{LDM} = (t) \cdot (\text{DP}) \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: t = valor t de Student para um nível de confiança de 99% e um desvio padrão com $n-1$ graus de liberdade ($t = 3,14$ para sete replicatas)
 DP = desvio padrão das análises das replicatas

O limite de detecção LDM deve ser determinado a cada seis meses, ou quando um novo operador começa o trabalho, ou quando há uma alteração significativa nos valores de background.

Avaliação da Recuperação do Analito, R%

A avaliação da Recuperação do Analito (R%) deve ser feita com fortificação de amostras ambientais com o analito de interesse.

Amostra Ambiental Fortificada em Laboratório (AFL) - o laboratório deve adicionar quantidades conhecidas do analito a pelo menos 5% (uma a cada 20) das amostras analisadas, em alíquotas duplicatas. A concentração do analito deve ser alta o suficiente para ser detectada acima da amostra original e não deve ser menor que quatro vezes o LDM. A concentração do analito adicionada deve ser a mesma daquela usada nos brancos de laboratório fortificados. Faixa recomendada para fortificação: entre 50% a 150% a concentração da amostra, verificada em teste preliminar.

Calcular a porcentagem de recuperação de cada analito, corrigidas pela concentração na amostra não fortificada. Comparar estes valores com os valores da média da recuperação da AFL na faixa de 90-110%. A porcentagem de recuperação pode ser calculada com a fórmula:

$$R\% = \left[\frac{(C_s - C)}{s} \right] \cdot 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:

R% = recuperação porcentual do analito

C_s = concentração da amostra fortificada

C = concentração corrigida com a amostra

s = concentração do analito adicionada à

amostra

De forma a evitar distorções em resultados de análises de amostras ambientais (matrizes), o volume adicionado na análise de recuperação não deve ser maior que 10% do volume original da amostra.

Recomenda-se adicionar a fortificação (em inglês, "*spike*") na amostra antes da digestão, para a determinação de Fósforo Total, levando-se a amostra até o volume final (método "*dilute to volume*"). Alternativamente, pode ser adotado o método de adição ao volume (método "*add on top*"). Realizar os cálculos de contribuições, pelas etapas:

A. Cálculo de C, multiplicando-se o resultado de concentração obtido na análise da amostra não fortificada pelo volume da amostra (tipicamente, 50 mL - volume adicionado de fortificação).

B. Cálculo de s (analito na fortificação): concentração da solução padrão (tipicamente 10 ug/mL) multiplicada pelo volume fortificado (tipicamente, 1 mL para 0,2 mg/L; 2 mL para 0,4 mg/L, etc.)

C. Cálculo de Cs (analito na amostra fortificada): resultado da concentração obtida na análise da amostra fortificada multiplicado pelo volume final da amostra (tipicamente 50 mL).

D. Substituir os valores na equação da recuperação do analito.

Se os dados de recuperação não estiverem na faixa de recuperação das AFL mas se os dados de performance do laboratório para aquele analito estão sob controle, o problema de recuperação observado pode ter relação com aspectos da matriz da amostra, não estando relacionados ao sistema.

Quando material de referência estiver disponível, este deve ser analisado e comparado aos limites de performance do método, sendo importante ferramenta de validação do método adotado.

3.1.8. Controle de Qualidade

Laboratórios utilizando um método de determinação de fósforo deve operar um programa de Controle de Qualidade (CQ). Um pré-requisito do programa é a realização de uma rotina de Verificação de Performance (VP) (ver sub-seção 3.1.7), contendo, no mínimo, demonstração inicial de performance e a análise periódica dos Brancos de Laboratório, Brancos Fortificados e outras solução como uma averiguação contínua de performance. O laboratório deve manter um registro das verificações conduzidas que atestam a qualidade das análises.

O Controle de Qualidade pode ser executado com a análise rotineira de alíquotas de Solução Padrão formulada a partir da Solução Padrão de Estoque SPE, preferencialmente validado por outras técnica como a Cromatografia Iônica e, preferencialmente, de solução contendo analito no padrão de referência obtido de fontes externas certificadas, na formulação de Amostra de Controle de Qualidade, ACQ.

Determinação dos Limites de Controle, LC's

Branco de Laboratório (BL) - Deve ser feita uma análise de BL por cada série de amostras.

Branco de Laboratório Fortificado (BLF) - Deve ser feita uma análise de BLF a cada série de amostras. Calcular a acurácia pela recuperação percentual. Se a recuperação de qualquer analito estiver fora do intervalo de 90-110%, o procedimento relacionado a aquele analito é considerado fora de controle e a origem do problema deve ser identificada e corrigida antes de proceder à análise de novas amostras.

Quando dados suficientes de análise de controle com BLF estiverem disponíveis (entre 20 a 30 análises), novos limites de controle poderão ser avaliados à partir da recuperação média e do desvio padrão das recuperações médias. Os limites inferior e superior podem ser estimados utilizando-se a seguinte fórmula:

$$LIMITE DE CONTROLE SUPERIOR = x + 3 \cdot DP \quad (\text{Eq. 4})$$

$$LIMITE DE CONTROLE INFERIOR = x - 3 \cdot DP \quad (\text{Eq. 5})$$

Após cinco a dez dados de recuperação, novos limites devem ser avaliados. Os dados de desvio padrão devem ser utilizados em relatórios de precisão do método e devem ser mantidos em registro para avaliações posteriores.

Análise de Amostra de Controle de Qualidade, ACQ

Amostra de Controle de Qualidade (ACQ) - Deve ser feita uma verificação dos padrões de calibração e de performance com a preparação e análise de uma ACQ. A preparação deve ser feita preferencialmente com padrões do analito obtidos externamente ao laboratório, de fontes certificadas. Se o resultado da determinação da concentração variar em 10% em relação ao valor esperado, a performance da condução do método não deve ser aceita. Neste caso, a origem do problema deve ser identificada e corrigida, antes de ser conduzida a análise para a determinação do Limite LDM ou outras análises.

3.1.9 - Calibração e Padronização

Preparar uma série de pelo menos três padrões, abrangendo o alcance desejado, e um branco na diluição da solução padrão do analito em balões volumétricos de 50 mL. As faixas recomendadas são de 0,0 a 0,10 mg/l e 0,20 a 1,00 mg/l, sendo a faixa de 0,20 mg/l a 1,00 mg/l, para uso com cubetas de caminho ótico (CO) de 10 mm, adotada neste trabalho. Alternativamente, sugere a referência APHA/SM a adoção da confecção de curvas de calibração em diferentes faixas:

- entre 0,01 e 0,25 mg/l para cubetas de CO de 50 mm,
- 0,15 a 1,30 mg/l para cubetas de CO de 10 mm e
- 0,30 e 2,00 mg/l para cubeta de CO de 5 mm.

Faixas de Calibração - Referências					
Referência	Caminho Ótico da Cubeta				
	100 mm	50 mm	25 mm	10 mm	5 mm
APHA/SM	-	0,01 a 0,25	-	0,15 a 1,30	0,30 a 2,00
USEPA,365.1	-	-	-	0,10 a 1,00	-
LANA ET ALI.	0,0006 a 0,1550	-	-	0,155 a 0,868	-
WISC. STATE	-	-	-	0,01 a 1,00	-

Tabela 10: faixas de calibração, em mg/L P, em função do caminho ótico da cubeta, por fontes diversas.

Processar padrões e brancos como descrito na sub-seção 3.1.10 Procedimento.

Preparar o equipamento de célula de fluxo como mostra a Figura 5.

Posicionar os frascos de padrões apropriados na ordem crescente e realizar as análises.

Preparar a curva de calibração plotando a resposta em absorbância do instrumento em função dos valores de concentração dos padrões. A curva de calibração pode ser determinada por software de regressão linear. O Coeficiente de Correlação Linear, R (Coef. de Pearson), deve ser maior ou igual a 0,995. Limites de Controle devem ser estabelecidos usando a diferença entre os valores lidos e os valores esperados.

Deve ser feita a leitura da Absorbância da solução de branco do analito de interesse, obtendo-se o valor para concentração zero. O valor obtido de $y(0)$ deve ser menor que o limite de quantificação do método, ou 0,040 mg/L P. Caso seja menor que a concentração mínima de quantificação, o valor obtido na leitura não deve ser utilizado na determinação da curva de calibração, forçando-se a curva para a condição $y(0) = 0$ (reta passando pela origem).

Depois de feita a calibração, esta deve ser verificada pela análise de uma Amostra de Controle de Qualidade (ACQ). Se as leituras excederem à faixa de $\pm 10\%$, as análises devem ser interrompidas e o instrumento deve ser recalibrado.

3.1.10 Procedimento

a) Configuração operacional da célula de fluxo

Para todos os experimentos foi utilizado o equipamento Espectrofotômetro UV-Vis Agilent modelo 8453, com detector em Arranjo de Diodos - DAD, com resolução espectral de 1,6nm, acoplado a sistema de célula de fluxo simples contendo bomba peristáltica.

O equipamento utilizado, o Espectrofotômetro UV-Vis com matriz de diodos DAD, indica que a fase de aquecimento dos componentes para melhor performance deve ser de, no mínimo, 40 minutos. Neste trabalho, ambas as lâmpadas, de filamentos de Tungstênio e Deutério, são ativadas para as análises, sendo todas as leituras realizadas após um período de 2 horas após o acendimento das lâmpadas.

Foram realizados sistematicamente testes de verificação de performance do aparelho, considerando-se a performance do detector e qualidade da luz incidente, obtendo valores satisfatório dentro da faixa prevista. Os testes de verificação e performance podem ser acessados na aba Mode>Verifications and Diagnostics. Recomenda-se a realização de teste tipo "Self-Teste" a cada trimestre.

As medições foram feitas com base na seguinte configuração do sensor:

- intervalo de leitura: 1 nm
- tempo de integração: 0,5 segundos
- faixa de leitura: 190 a 1100 nm

A vazão volumétrica na bomba peristáltica foi regulada em 5,0 mL/min.

Antes e após cada seção de análise das amostras, foi mantido um fluxo de água destilada por pelo menos 3 minutos.

Para a leitura de espectrograma de branco, a bomba peristáltica foi acionada manualmente por 3 minutos contínuos, imprimindo fluxo de água destilada preparada (branco de PO_4 , reagida com o Reagente Combinado) pela cubeta de fluxo. Após este período, foram feitas 03 (três) leituras de branco com fluxo de 20 segundos (aproximadamente 1,7 mL pela cubeta) entre as leituras, adotando-se como espectrograma "branco" para a determinação da curva de calibração de PO_4 a última leitura obtida.

Na configuração de operação, as curvas de calibração atualizadas devem ser carregadas no método. Para a organização dos arquivos, devem ser criadas, na pasta do operador, pastas exclusivas do analito e pastas referentes ao ano de criação dos arquivos. Quanto ao nome dos arquivos de padrões e amostras, recomenda-se inserir ao nome do arquivo a data da criação do arquivo contendo os padrões da curva de calibração, no formato "mmdd_pdn.std", indicando o mês e o dia da realização das leituras, seguidos da abreviação pdn (de "padrões não digeridos) ou pdd (de "padrões digeridos"), com a terminação .std (de "padrões") ou .sd (de "amostras).

O menu "task" (tarefa) devem ser colocado em "Quantificação", sem correção de background. Na seção de Concentração, entrar com a unidade em mg/L. Selecionar as opções de "prompt" (entrada de dados via usuário) para padrões e amostras. Na função de tipo de dado deve ser escolhida "Absorbância".

Na aba "Sampling" (ensaio da amostra), deve ser escolhida a opção "Sipper" (célula de fluxo), com configuração de cubeta de 10 mm. Na escolha dos parâmetros, optou-se pelo bombeamento de amostra por 20 segundos previamente à análise, na direção horária (sentido de entrada na cubeta). Alternativamente, pode ser escolhida a opção de passagem pela cubeta de volume de ar, sendo necessária a determinação de tempo em segundos no campo "air segment", e de passagem de solução de enxague (podendo ser utilizada a solução de branco em uso), sendo necessária a determinação de tempo em segundos no campo "wash time" e a mudança manual de frasco doador. Tais alternativas, apesar de produzirem aumento no tempo de análise das amostras, são facilmente programáveis em sistemas dotados de amostradores automáticos do tipo XY.

As condições típicas do ambiente de laboratório e das amostras foram:

temperatura ambiente: 23,7 °C

pressão atmosférica: 760 mm Hg (1 atm)

umidade ambiente: 15% UR

temperatura das amostras padrão: 23,2°C

pH típico das amostras PO₄ reagidas: 1,266

condutividade das amostras padrão (de laboratório): 124,5 µS/cm

Disposição típica de equipamentos:

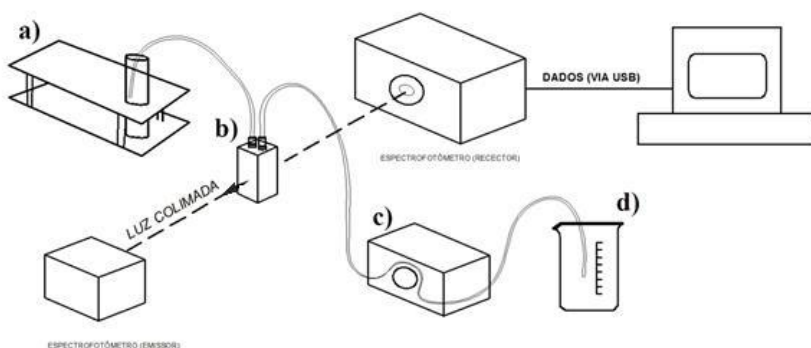


Figura 5: Esquema de disposição de equipamentos no método. A c) bomba peristáltica opera mantendo fluxo de massa da a) amostra reagida pela b) cubeta de fluxo, levando ao descarte em d). O espectrofotômetro do modelo utilizado opera bipartido, com unidade contendo as lâmpadas de tungstênio e de deutério emitindo feixe de luz colimada através da cubeta e incidente sobre sensor de matriz de diodos na outra unidade. Os dados gerados pelas leituras são enviados para armazenamento em unidade computacional processada via USB. Tal unidade possui programa computacional que controla a bomba peristáltica e a abertura do obturador da janela de luz incidente.

Condições de operação padrão de ensaios

O fluxo de trabalho foi ajustado na bomba peristáltica para 5,0 mL/min.

A configuração da montagem das microtubulações seguiu a forma descrita na Tabela 11.

	comprimento [m]	volume [mL]	tempo de retenção [s]
Microtubulação de entrada (intake)	0,25	0,50	10
Cubeta	-	0,08	1,6
Microtubulação de saída (purge)	1,00	2,00	40

Tabela 11: características das tubulação utilizados na montagem da células de fluxo.

De forma a otimizar os tempos de procedimento e garantir a qualidade da leitura, foi adotada a configuração de operação de tempo de bombeamento inicial igual a 20 segundos para cada leitura, correspondendo a 1,7 mL, suficiente, portanto, para o enxague da cubeta com a própria amostra. Assim, cada leitura consumiu 1,7 mL da amostra.

A cada análise dos padrões de calibração da curva de calibração, o operador deve comparar a leitura da Absorbância, em Unidades de Absorbância, UA, com os valores dos Limites de Controle. Caso obtenha valores com diferenças maiores de 10% em relação aos LC's, deve ser feita nova leitura, fazendo passar a amostra por 20 segundos (tempo padrão deste método) pela cubeta. Caso a diferença persista, deve ser retomado o procedimento de preparação, fazendo percorrer pela cubeta um fluxo água destilada, de ar e, então, de branco, por pelo menos 20 segundos cada, perfazendo novamente a análise na concentração padrão não conforme.

A obtenção de 3 leituras a partir da mesma amostra consumiu 5,1 mL de amostra em um período de aproximadamente 90 segundos de análise por amostra.

b) Preparação dos brancos, padrões e amostras / Determinação das espécies

De todas as amostras ambientais foram retiradas, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, alíquotas de 50 mL para a formulação dos brancos ambientais e determinação de cada espécie de fósforo. As alíquotas foram colocadas em béqueres de 100 mL.

Para a formulação dos padrões de calibração digeridos e não digeridos foram utilizados balões volumétricos de 50 mL cada. As amostras contendo padrões para a determinação de Fósforo Total foram vertidas em erlenmeyers de 125 mL e digeridas com aquecimento. As amostras contendo padrões para a determinação de PO_4 foram colocadas em béqueres de 100 mL.

Fósforo Total

Adicionar uma gota de Solução de Fenolftaleína a cada amostra ambiental em um béquer de 100 mL. Se a cor rosa aparecer, neutralizar com Solução de H_2SO_4 a 11 mol L^{-1} em gotas até obter solução incolor. Amostras ácidas devem ser neutralizadas com uma solução de Hidróxido de Sódio 1 mol L^{-1} (40 g NaOH/L).

Adicionar 1 mL de solução de H_2SO_4 a 11 mol L^{-1} .

Adicionar 0,5 g de persulfato de potássio anteriormente separados em tubos de ensaio de 8 mL, cada.

Ferver levemente numa placa de aquecimento pré-aquecida por 30 a 40 minutos, ou até o volume final for aproximadamente 10 mL. Não deixar secar. Alternativamente, aquecer por 30 minutos em autoclave a 121°C (15 a 20 psi).

Resfriar. Adicionar uma gota de solução de fenolftaleína. Neutralizar com solução de hidróxido de sódio 10 mol L^{-1} em gotas (consumo típico: 20 a 30 gotas) até aparecer tonalidade rosa claro.

Diluir a amostra até 50 mL em frasco volumétrico. Se a amostra apresentar turbidez, proceder à filtração. Recomenda-se retornar o conteúdo ao frasco béquer original.

Determinar a concentração de fósforo como descrito na subseção 3.1.10 c.

Fósforo Hidrolisável

Adicionar uma gota de solução de fenolftaleína a cada amostra ambiental em um béquer de 100 mL. Se a cor rosa aparecer, neutralizar com solução de H_2SO_4 11 mol L^{-1} em gotas até obter solução incolor. Amostras ácidas devem ser neutralizadas com uma solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (40 g NaOH/L).

Adicionar 1 mL de solução de H_2SO_4 11 mol L^{-1} .

Ferver levemente numa placa de aquecimento pré-aquecida por 30 a 40 minutos, ou até o volume final for aproximadamente 10 mL.

Não deixar secar. Alternativamente, aquecer por 30 minutos em autoclave a 121 °C (15 a 20 psi).

Resfriar. Adicionar uma gota de solução de fenolftaleína. Neutralizar com solução de hidróxido de sódio 10 mol L⁻¹ em gotas (consumo típico: 20 a 30 gotas) até aparecer tonalidade rosa claro.

Diluir a amostra até 50 mL em frasco volumétrico. Se a amostra apresentar turbidez, proceder à filtração. Recomenda-se retornar o conteúdo ao frasco béquer original.

Determinar a concentração de fósforo como descrito na subseção 3.1.10 c.

Ortofosfato

Adicionar uma gota de solução de fenolftaleína a cada amostra ambiental em um béquer de 100 mL. Se a cor rosa aparecer, neutralizar com Solução de H₂SO₄ 11 mol L⁻¹ em gotas até obter solução incolor. Amostras ácidas devem ser neutralizadas com uma solução de Hidróxido de Sódio 1 mol L⁻¹ (40 g NaOH/L).

Determinar a concentração de fósforo como descrito na subseção 3.1.10 c.

Branco de Laboratório para Curva de Calibração (não digerida, para Ortofosfato)

Solução de branco de laboratório para a curva de calibração (não digerida): em copo béquer de 100 mL, adicionar 8 mL da solução de reagente combinado em 50 mL água destilada digerida, formando o branco de laboratório. Utilizar na análise de padrões não digeridos (para a determinação de Ortofosfato) para a curva de calibração.

Branco de Laboratório para Curva de Calibração (digerida, para Fósforo Total)

Solução de branco de laboratório para a curva de calibração (digerida): em copo béquer de 100 mL, adicionar 8 mL da solução de reagente combinado em 50 mL água destilada digerida, formando o branco de laboratório. Utilizar na análise de padrões digeridos para a curva de calibração para P total.

Branco de Laboratório para Amostras Ambientais com Cor (não digerida, para Ortofosfato)

Solução de branco de laboratório para amostras com cor: em copo béquer de 100 mL, adicionar 8,0 mL da solução de reagente combinado para branco de amostras com cor em 50 mL da amostra ambiental não digerida, formando o branco de laboratório. Utilizar primordialmente em análise de amostras ambientais que apresentam cor.

Branco de Laboratório para Amostras Ambientais com Cor (digerida, para Fósforo Total)

Solução de branco de laboratório para amostras com cor: em copo béquer de 100 mL, adicionar 8,0 mL da solução de reagente combinado para branco de amostras com cor em 50 mL da amostra ambiental digerida, formando o branco de laboratório. Utilizar primordialmente em análise de amostras ambientais que apresentam cor.

c) Análise de Brancos, Padrões e Amostras Ambientais

Inocular 1,6 mL de reagente combinado em cada tubo de ensaio de 15 mL que receberão as alíquotas de padrões e amostras. Transferir 10 mL de amostra (ou padrão) para os tubos de ensaio. Com base no teste de concentração prévio, realizar diluição da amostra com água destilada nos fatores 1:2, 1:4 e 1:10 em tubos de ensaio, observando a coloração ou analisando no aparelho, de forma a enquadrar a concentração na faixa de detecção ideal, entre 0,1 e 0,6 UA.

Proceder à montagem de equipamento descrita na seção 3.1.10 a), realizando fluxo contínuo, conforme descrito, com água destilada e com branco de laboratório referente ao tipo de ensaio.

Analisar e obter espectrograma de branco. Repetir até obter uma linha de base estável com bombeamento de Solução de branco de laboratório. Proceder à análise do branco BL, obtendo leitura da curva de calibração para a concentração 0,0 mg/L.

Analisar as soluções-padrão e obter os pontos e a equação da curva de calibração. Utilizar preferencialmente as concentrações de 0,20; 0,60; e 1,00 mg/L P para cubetas de caminho óptico de 10mm. Na janela de "prompt" após cada análise, incluir a correção de volume no campo "Purity", ou teor, correspondente ao valor FCC da seção 3.1.11.

No campo "Weight", acrescentar o valor da massa dos padrões em mg e no campo "Volume", acrescentar o valor 1. Anotar os resultados de K1, b e do coeficiente R.

Caso haja controle satisfatório do método pelo laboratório, obtendo-se valores de absorvância sem diferença significativa entre padrões digerido e não digeridos, pode ser dispensada a digestão dos padrões na confecção da curva de calibração do instrumento.

Para todas as análises de amostras e brancos ambientais, realizar homogeneização das soluções nos tubos com o auxílio de um gerador de vórtex pouco antes das análises no equipamento.

Analisar os brancos de cada amostra ambiental que apresenta cor, corrigindo o background das análises de cada amostra ambiental para Ortofosfato, Fósforo Hidrolisável e Fósforo Total.

Realizar a análise de amostra ambiental fortificada a cada 10 análises de amostras ambientais, utilizando-se soluções de concentração iguais às dos padrões da curva de calibração. Anotar os resultados.

Realizar as medições das soluções nos tubos entre 8 e 45 minutos após a reação de coloração.

Proceder às análise de cada amostra permitindo o fluxo da amostra seguinte atuando como enxague da célula de fluxo.

Realizar leitura de solução de padrão SVPI de verificação a cada 10 amostras ambientais. Caso seja encontrado valor fora dos limites de controle, fazer passar pela célula de fluxo um volume de 1,7 mL (aproximadamente 20 segundos à vazão de 5 mL/min) de ar antes da próxima análise, repetindo-se as análises posteriores à última verificação. Anotar os resultados.

3.1.11 Análise de Dados e Cálculo

Preparar uma curva de calibração plotando as leituras de absorvância em função das concentrações dos padrões. Calcular a concentração das amostras substituindo o valor da absorvância na fórmula da curva de calibração. Multiplicar a resposta pelo teor do analito. Para o método proposto, o volume final do padrão é 11,6 mL, e o volume original da alíquota é de 10 mL, sendo o valor de correção de teor a razão entre eles, igual a 0,862.

Apresentar apenas os valores que estiverem entre os limites dos padrões de calibração. Amostras apresentando valores maiores devem ser diluídas e reanalisadas.

Apresentar os resultados em mg P/L com 3 casas decimais.

Como resultado das análises, obtêm-se leituras de absorvância em função da concentração do analito. A regressão linear dos dados obtidos resulta na Equação 6.

$$\text{Abs}[UA] = A(x) + B \quad (\text{Eq. 6})$$

onde: $\text{Abs}[UA]$ = absorvância, em Unidade de Absorvância $[UA]$
 A = inclinação da reta (abs/conc.), em $[UA]/[\text{mg/L}]$
 x = conc. teor padrão $[\text{mg/L}]$
 B = interceptação da reta no eixo y, em $[UA]$.

$$CA \left[\frac{\text{mg}}{L} P \right] = \frac{\text{Abs}[UA] - B}{A} \times FCC \quad (\text{Eq. 7})$$

onde: CA = concentração em mg/L de P obtida pela Curva de Absorvância
 $\text{Abs}[UA]$ = absorvância, em unidades de absorvância, para o comprimento de onda de 880nm.
 B = interceptação da curva de calibração no eixo y, em $[UA]$.
 A = inclinação da Curva de Absorvância.
 FCC = Fator de Correção de Concentração (teor real).

Tomando-se tipicamente o valor de FCC como 0,862, e substituindo-se na fórmula, obtém-se a fórmula da curva de calibração:

$$\text{Conc. } P \left[\frac{\text{mg}}{L} P \right] = K_1 \cdot \text{Abs}[UA] - \text{Beq} \quad (\text{Eq. 8})$$

onde: C = concentração em mg/L de P
 $\text{Abs}[UA]$ = absorvância, em unidades de absorvância, para o comprimento de onda de 880nm.
 Beq = interceptação da Curva de Absorção no eixo y, equivalente a $(B \cdot FCC)/A$, em $\text{mg/L } P$.
 K_1 = inclinação da curva de calibração, equivalente a FCC/A .

Na metodologia proposta, utiliza-se rotina computacional que fixa o valor $C(0) = 0$, forçando a curva de calibração a passar pela origem (concentração de branco = 0), obtendo-se a Equação da Curva de Calibração:

$$CEQ \left[\frac{\text{mg}}{L} P \right] = K_c \cdot \text{Abs}[UA] \quad (\text{Eq. 9})$$

onde: CEQ = concentração em mg/L de P obtida pela equação da curva de calibração

K_c = inclinação da curva de calibração, equivalente a FCC/A corrigido.

Correção da concentração de fósforo pelo Fator de Diluição:

$$CP[mg/L\ P] = CEQ * \frac{vol.\ final}{vol.\ inicial} * fat.\ dil \quad (Eq. 10)$$

onde: CP [mg P/L] = concentração em mg/L de P total, final
 CEQ = concentração em mg/L de P obtida pela equação da curva de calibração
 volume final = volume da amostra (geralmente 50 mL) + volume de reagentes utilizados (geralmente 8,0 mL).
 volume inicial = volume inicial da amostra (geralmente 50mL)
 fat. diluição = fator de diluição (tipicamente 2,4 ou 10)

Os fatores de diluição são tipicamente 2, 4 e 10, correspondendo às diluições de 50%, 25% e 10%, respectivamente.

3.1.13 Performance do Método

Preferencialmente, devem ser colocadas em prática uma verificação de Performance do Método convidando laboratórios externos que utilizam técnicas espectrofotométricas a analisar amostras fortificadas com incrementos definidos de Ortofosfato, secretas aos laboratórios, anotando-se os resultados e calculando-se a acurácia das medições. A Tabela 12 representa um exemplo hipotético dos resultados e da determinação da acurácia do método proposto.

<i>Incremento de Ortofosfato mg P/L</i>	<i>Precisão em Desvio Padrão mg P/L</i>	<i>Acurácia, %</i>	<i>Acurácia, mg P/L</i>
-			
0,04	0,019	+16,7	+0,007
0,04	0,014	-8,3	-0,003
0,29	0,087	-15,5	-0,050
0,30	0,066	-12,8	-0,040

Tabela 12: Exemplo hipotético de resultados de medições feitas por outros laboratórios.

3.2 Proposta de Método para a determinação de CLOROFILA 'A' em amostras de água²

3.2.1 Aplicação

A clorofila *a*, um pigmento característico de algas, constitui-se aproximadamente em 1 a 2% (peso seco) de biomassa de algas plancônicas. Esta característica faz da clorofila *a* um indicador de biomassa de algas.

Este método é aplicável à análise de águas superficiais em geral.

3.2.2 Sumário do Método

Células de algas podem ser concentradas pela filtração de volume conhecido através de membrana filtrante, por exemplo, de nitrocelulose de 47 mm e 0,45 µm de tamanho de poro. Os pigmentos são extraídos de amostras concentradas de algas em solução aquosa de acetona. A concentração de clorofila *a* é determinada por espectrofotometria na medição da absorbância (densidade óptica) do extrato em diferentes comprimentos de onda. O resultado das medições de absorbância são então aplicados em fórmula pré-determinada.

3.2.3 Preservação da Amostra e Preparação

Amostras de água contendo para análise de clorofila *a* devem ser armazenadas em ambientes escuros e resfriados a 4 °C, em gelo.

Filtrar de 50 a 2000 mL de amostra através de uma membrana filtrante, aplicando vácuo até o volume final da amostra.

Adicionar 0,2 mL de solução em suspensão de carbonato de magnésio - $MgCO_3$ durante a fase final da filtração.

Dobrar o filtro em quartos, embalar em folha de alumínio, colocar em dessecador e congelar.

As amostras de água podem ser mantidas congeladas por até 30 dias se retiradas de amostras com pH 7 ou maior. Amostras de águas ácidas devem ser processadas imediatamente.

² adaptação direta da publicação "ESS METHOD 150.1 - CLOROPHYLL - SPECTROPHOTOMETRIC", revisão de 1991, editado pela Inorganic Chemistry Unit da Environment Science Section, Wisconsin State Lab of Hygiene em Madison, WI, em linguagem expositiva, contendo detalhamento de procedimentos.

3.2.4 Comentários

A feofitina, um produto da degradação natural da clorofila, tem um pico de absorção óptica na mesma região espectral da clorofila *a*. Pode ser necessárias correções se a concentração de feofitina seja muito alta.

Clorofila *a* Corrigida se refere ao método com correção de feofitina (método de acidificação).

Clorofila *a* Não Corrigida refere-se ao método sem correção de feofitina (método Tricromático).

Manipular amostras sob luz tênue de forma a prevenir a quebra da molécula de clorofila.

Proteger totalmente da luz o extrato de clorofila em acetona.

3.2.5 Equipamento e Montagem

- Banho de ultrassom.
- Espectrofotômetro Agilent UV-Vis modelo 8453 com Matriz de Diodos, com resolução de 1,6 nm.
- Sistema de Célula de Fluxo, contendo bomba peristáltica e cubeta de fluxo com caminho óptico de 10 mm.
- Centrífuga com capacidade para 500 g para tubos de centrífuga de 15 mL graduados.
- Caixa escura com capacidade para o armazenamento de um suporte de tubos de ensaio.
- Sistema de filtração para filtros de 47 mm, com suporte em vidro sinterizado, acoplado à bomba de vácuo.
- Vidrarias.
- Filtros de Nitrocelulose de 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,45 μm .

3.2.6 Reagentes

Solução aquosa de Acetona 9:1 v/v: misturar 90 partes de acetona padrão reagente com 10 partes de água destilada. Solução de Ácido Clorídrico a 0,1 mol L⁻¹: adicionar 8,3 mL de ácido clorídrico padrão reagente e diluir até 1000 mL com água destilada.

Suspensão a 1% de Carbonato de Magnésio: adicionar 1,0 g de carbonato de magnésio em pó a 100 mL de água destilada.

3.2.7 Procedimento

Colocar o filtro contendo a amostra concentrada de clorofila em um tubo de centrífuga.

Adicionar aproximadamente 10 mL de solução aquosa de acetona. Tampar e colocar em câmara escura.

Colocar o tubo contendo a amostra em banho de ultrassom e sonicar por 10 minutos. Completar para 13 mL com solução de acetona e retornar para a câmara escura. Colocar a câmara escura em ambiente resfriado a 4 °C e deixar por 12 horas.

Após repouso, agitar o conteúdo do frasco e centrifugar por 20 minutos a 500 x g.

Cuidadosamente, transferir o extrato clarificado para uma proveta graduada de 15 mL de paredes escuras e realizar as medições por espectrofotometria em cubeta de fluxo de 10 mm de caminho óptico para os comprimentos de onda de 750, 665 e 663 nm para a determinação de Clorofila *a* Corrigida.

Manter a faixa de absorbância entre 0,2 e 0,6 UA no comprimento de onda 663 nm por diluições dos extratos.

Imediatamente após a leitura nos comprimentos de onda, adicionar 0,2 mL (aproximadamente 4 gotas) de HCl a 0,1 mol L⁻¹ ao extrato (que deve ter o volume aproximado de 10 mL), misturar. Aguardar 90 segundos e realizar as medições nos comprimentos de onda típicos.

Descartar a amostra e enxaguar a célula de fluxo com o fluxo de 5,0 mL/min por 1 minuto com solução aquosa de acetona 9:1 v/v.

Repetir as medições até todas as amostras sejam analisadas.

3.2.8 Cálculos

Determinar a absorbância diretamente das leituras.

Para o cálculo da Clorofila *a* Corrigida, determinar a absorbância a 665 e 750 nm após a acidificação.

Subtrair a absorbância à 750nm da absorbância à 665nm, para a correção de turbidez.

Calcular as concentrações de clorofila *a* e de feofitina a inserindo as leituras de absorbância relativas à turbidez nas equações 11 e 12.

$$\text{Cl a Cor. [ug/L]} = 26,73 (663b - 665a) \cdot E \cdot \frac{F}{(V \times L)} \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\text{Feo a [ug/L]} = 26,73 [1,7 (665a) - 663b] \cdot E \cdot \frac{F}{(V \times L)} \quad (\text{Eq.12})$$

onde: F = fator de diluição (caso o extrato tenha sofrido diluição)

E = volume de acetona usado na extração (mL)

V = volume de água filtrada (L)

L = caminho óptico da célula (cm)

665a = absorbância à 665nm após acidificação

663b = absorbância à 663nm antes da acidificação

4 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS - VARIAÇÕES DE LABORATÓRIO

4.1 FÓSFORO

Os experimentos de 1 a 4 (subseções 4.1.1 a 4.1.4) utilizaram amostras não digeridas, elaboradas em laboratório, contendo apenas o analito puro di-hidrogeno fosfato de potássio, o mesmo composto utilizado na elaboração dos padrões de calibração.

Os experimentos 5 a 8 utilizaram amostras ambientais, denominadas matrizes por conter substâncias de natureza, origem e concentração desconhecidas. Todas as amostras coletadas em campo foram digeridas e analisadas espectrofotometricamente, bem como os brancos de laboratório e os padrões das curvas de calibração.

4.1.1 Experimento 1: Curva de calibração/determinação da faixa linear

Foram dispostos 09 (nove) balões volumétricos Classe A de volume 50 mL, rotulando-os de acordo com o esquema descrito na Tabela 13.

	padrões de calibração								
frasco	1	2	3	4	5	6	7	8	9
conc. padrão [mg/L]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,6	2,0
	tubos de ensaio								
volume reag comb [mL]	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
vol. final padrão [mL]	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6
FCC	0,862	0,862	0,862	0,862	0,862	0,862	0,862	0,862	0,862
Conc Final [mg/L]	0	0,172	0,345	0,517	0,690	0,862	1,035	1,379	1,724

Tabela 13: volumes de amostra e reagente combinado utilizados na formulação dos padrões de calibração.

A solução padrão utilizada possuía a concentração de 10 mg/L P. De cada frasco, foi retirada uma alíquota de 10 ml e colocada em tubo de ensaio de 27 mL. Foi adicionado a cada tubo o volume de 1,6 mL da solução de reagente combinado. As soluções padrão nos tubos de ensaio foram agitadas e analisadas em espectrofotômetro a 880 nm, obtendo-se os resultados mostrados na Figura 6. As curvas espectrométricas podem ser vistas na Figura 7.

Observa-se que a metodologia de determinação de Ortofosfato (fósforo reativo) com técnica espectrofotométrica não apresenta linearidade para concentrações acima de 1,00 mg/L. Desta forma, foram determinadas as concentrações dos padrões de calibração para 0 (apenas para fins de Controle de Qualidade); 0,2; 0,6 e 1,0 mg/L.

Foi realizada uma análise estatística dos dados dos valores de leitura para padrões de 0; 0,10; 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 e 1,00 mg/L P, obtendo-se valores médios das leituras, a partir dos quais foram realizados procedimentos de regressão linear sobre os dados médios para a obtenção dos valores de k_1 (inclinação da curva em relação ao eixo X (valores das concentrações padrão), forçando-se o valor de zero para a leitura de branco. Os valores médios foram reanalisados para a determinação da curva de calibração final. Os valores finais foram comparados os valores individuais para a estimativa da variação entre eles.

A regressão linear dos dados obtidos resulta na seguinte equação (Eq. 6):

$$y = k_1(x) + b$$

onde: y = absorvância, em Unidade de Absorvância [UA]
 k_1 = inclinação da reta (abs/conc.), em [UA]/[mg/L]
 x = conc. padrão [mg/L]
 b = intercepção da reta no eixo y , em [UA].

<p><i>Equação da Curva de Absorvância típica (para Ortofosfato):</i> $Abs [UA] = 0,7245 x + 0,0028$</p>

Equação Inicial da Curva de Calibração, obtida à partir da Curva de Absorvância corrigida para $Abs(0) = 0$, para $K_C = 1,3826$:

$$CEQ \left[\frac{mg P}{L} \right] = 1,3826 \cdot Abs \quad (Eq. 13)$$

Correção da concentração de fósforo pelo Fator de Diluição (Eq. 10):

$$CP [mg/L P] = CEQ * \frac{\text{volume final}}{\text{volume inicial}} * \text{fat. diluição} \quad (\text{Eq. 14})$$

onde: CP [mg/L P] = concentração em mg/L de P final
 CEQ = concentração em mg/L de P obtida pela equação da curva de calibração
 volume final = volume da amostra (geralmente 10 mL) + volume de reagentes utilizados (geralmente 1,6 mL), igual a 11,6 mL
 volume inicial = volume inicial da amostra (geralmente 10 mL)
 fat. diluição = fator de diluição (tipicamente 2, 4 ou 10)

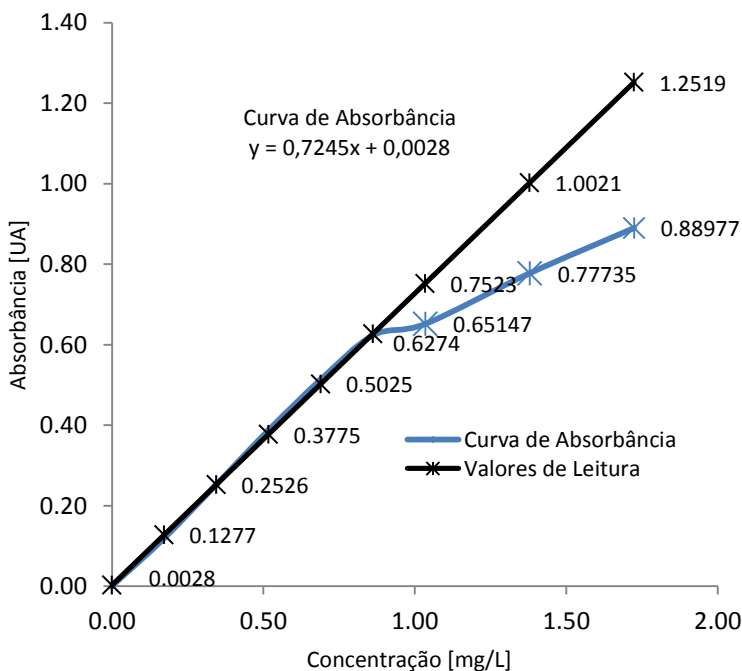


Figura 6: Gráfico da curva de absorvância média, sem correção de zero, e indicação da faixa linear de calibração, médio. Os dados sobre a reta correspondem aos valores ideais, em Coef. de Correlação igual a 1. Observa-se que em concentrações acima de 1,00 mg/L P ocorre um comportamento não linear no sinal do sensor.

	resultados das leituras									
F#	1	2	3	4	5	6	Parâmetros para a regressão linear, $y=k1(x)+b$			
conc. padr [mg/L]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0				
FCC	0,862	0,862	0,862	0,862	0,862	0,862				
Teor [mg/L]	0	0,172	0,345	0,517	0,690	0,862				
	Absorbância, leituras à 880nm [UA]						A (incl.)	B (inter.)	r*	P>F
Curva 1	0,0004	0,1193	-0,0004	0,9996	2,76E-5	0,2529	0,3879	0,5134	0,6233	0,7344
Curva 2	0,0004	0,1179	0,0007	0,9986	1,45E-4	0,2443	0,3980	0,4998	0,6127	0,7227
Curva 3	0,0004	0,1321	0,0082	0,9995	3,00E-4	0,2628	0,3859	0,5031	0,6180	0,7166
média	0,0004	0,1231	0,0028	0,9994	0,0002	0,2533	0,3906	0,5054	0,6180	0,7245

Tabela 14: resultados das leituras e regressão linear das medições dos padrões de calibração.

* Coeficiente Linear de Pearson, r, equivalente à raiz quadrada do Coeficiente de Correlação r^2 (para análises univariáveis).

Observa-se, na Figura 6, que a regressão linear para a obtenção da curva de calibração utilizando-se a média dos valores médios correspondentes às leituras das diferentes concentrações padrões não formou reta representativa ($p \gg 0,05$). Contudo, observa-se que é formada uma reta bem modelada ($p < 0,01$) obtida por regressão a partir dos resultados das leituras das concentrações entre 0,2 e 1,0 mg/l. Ainda, observa-se que os valores de absorbância em Unidades de Absorbância - UA para a faixa 0,2 a 1,0mg/l estão situados na faixa ideal de detecção, entre 0,2 e 0,6 UA.

Assim, para os experimentos de determinação de concentração de fósforo em águas superficiais adotando-se esta metodologia, com a utilização de cubetas de caminho óptico de 10 mm, serão adotadas as

soluções padrão nas concentrações 0,2; 0,6 e 1,0 mg/L para a determinação das curvas de calibração do instrumento.

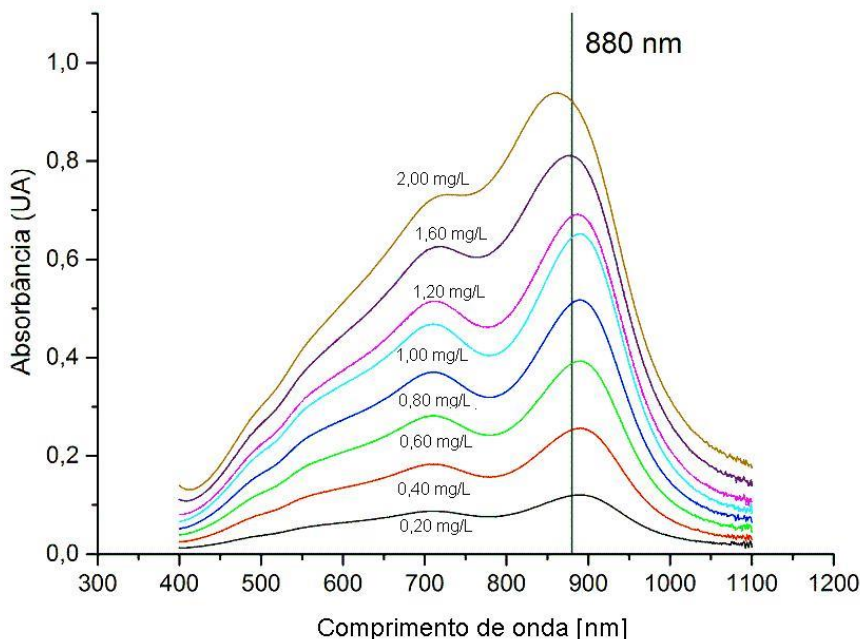


Figura 7: Gráfico com os espectros de absorvância para diferentes concentrações de padrões. Observa-se que o pico de absorvância desloca-se da direita para a esquerda em relação ao comprimento de onda de ensaio, 880nm. Para este comprimento de onda, observa-se que a resposta do sensor tem incrementos constantes com o aumento no incremento de concentração (0,20 mg/L P), até a concentração de 1,00mg/L P.

A adequação de amostras com concentrações maiores será feita através de diluições. As determinações de concentrações de amostras contendo concentrações menores que 0,2 mg/l serão feitas com cubetas de caminho óptico de 50mm ou maior. Para absorvâncias fracas, podem ser conduzidos procedimentos para a redução do ruído, de forma a otimizar-se a relação sinal/ruído (relação S/R), pela maior abertura da fenda para maior incidência de luz, e aumentando-se o número de pontos de leitura na faixa de vizinhança do comprimento de onda de interesse.

Os métodos de determinação de fósforo mais consolidados recomendam o volume das soluções de calibração como sendo 50 mL

(APHA/SM, 2012) ou 100 mL (USEPA, 1993). Alternativamente, para a faixa de 0,1 a 1,0 mg/l, pode ser utilizado o volume de 25 mL. Neste trabalho, toda a preparação dos padrões se deu em volume de 50 mL, sendo extraída uma alíquota de 10 mL para ser reagida com solução de reagente combinado para a revelação da absorbância à 880nm.

4.1.2 Experimento 2: Viabilidade da amostra reagida

Foram preparadas amostras de 100 mL de soluções padrão P-PO₄ (di-hidrogeno fosfato de potássio - KH₂PO₄) nas seguintes concentrações:

0,2 mg/L P

0,6 mg/L P

Previamente às análises das amostras contendo o analito de interesse, o ortofosfato, a cubeta de fluxo foi lavada por 3 minutos com a solução de branco com fluxo de 5,0 mL/min. Após, foram realizadas as calibrações de branco (em inglês, "*blank*") do detector em três sequências de 20 segundos.

As amostras de laboratório contendo a analito a 0,20 e 0,60 mg/l foram reagidas com a solução de reagente combinado e então analisadas logo em seguida, alternadamente, sendo os tempos de análise e os resultados de absorbância relacionados na Tabela 15.

Observa-se, a partir dos resultados das leituras em função do tempo, que há uma tendência de decréscimo na absorbância da solução com concentração de 0,60 mg/L (sem correção volumétrica). Com base em calibração anterior, a diferença nominal entre o valor médio da leitura em 10 minutos e a leitura em 30 minutos foi de -0,44 %, ou 0,0023 mg/l e entre 10 e 40 minutos de 0,0026 mg/L (-0,48%), para curva forçando a zero. Assim, observa-se, pelos resultados produzidos no experimento, que há variação significativa na terceira casa decimal em leituras ao tempo de 40 minutos a partir da inoculação do reagente combinado contudo, em valores percentuais, apresentou variação bastante inferiores em relação aos valores considerados de erro de precisão de leitura, aceitos em até 10%, indicando estabilidade de valores no período superior àquele preconizado em diferentes metodologias.

		Valores de Absorbância, em UA									
		tempo [min]									
conc.. [mg/L]		5	10	15	20	25	30	40	60	90	120
0,20	Lei- tura [UA]	-	0,1275	0,1275	0,1280	0,1269	0,1269	0,1276	0,1282	0,1290	0,1299
	Erro* [%]	-	0,00	0,00	+0,11	-0,16	-0,18	+0,02	+0,16	+0,37	+0,60
0,60	Leitu- ra [UA]	0,3892	0,3890	0,3880	0,3881	0,3879	0,3873	0,3871	0,3865	0,3861	0,3858
	Erro* [%]	0,30	0,26	0,00	0,02	-0,01	-0,18	-0,22	-0,39	-0,49	-0,57

Tabela 15: dados de leitura de absorbância à 880 nm de amostra reagida, em função do tempo. O valor da leitura à 15 minutos é considerado como o de referência.

* Erro relativo à leitura central, aos 15 minutos.

Para a concentração de 0,20 mg/L, observou-se uma tendência de acréscimo de concentração em função do tempo, apresentando estabilidade no incremento até pelo menos 90 minutos após o início do experimento. Com base em calibração anterior, a diferença nominal entre o valor médio da leitura em 10 minutos e a leitura em 60 minutos foi de +0,16 %, ou 0,0010 mg/l e entre 10 e 90 minutos de 0,0021 mg/L (0,37%). Assim, observa-se, pelos resultados produzidos no experimento, que há variação significativa na terceira casa decimal em leituras em tempo de 60 minutos a partir da inoculação do reagente combinado, contudo com variações pouco representativas.

As leituras, neste trabalho, foram realizadas no período entre 10 a 30 minutos após a inoculação do reagente combinado nas amostras. A faixa ideal de leitura considerada por diferentes literaturas tais como em Lana, APHA e USEPA, varia entre 10 minutos e 45 minutos após a inoculação do reagente.

Tal experimento tem por objetivo avaliar o comportamento da amostra preparada em laboratório analisada tardiamente, permitindo o prolongamento da seção de análise para acima de 30 minutos. A análise de amostras após reagidas em tempos acima de 30 minutos pode ser necessária no caso de atrasos na análise, principalmente quando realizadas em equipamentos sem amostradores automáticos e em seguida à preparação da curva de calibração do instrumento.

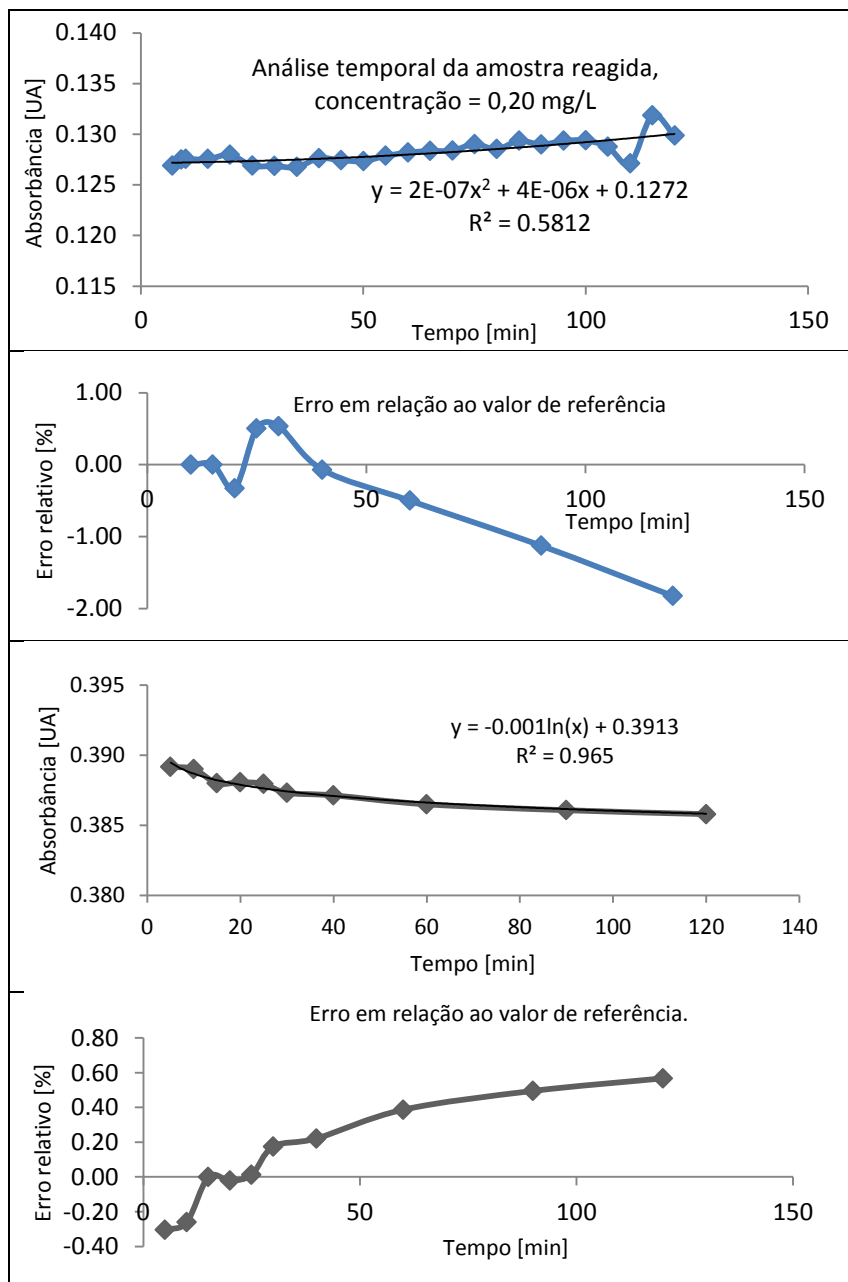


Figura 8: Gráficos de tendência temporal e erro relativo da amostra reagida.

4.1.3 Experimento 3: Determinação do Limite de Detecção do Método e Verificação de Performance de Laboratório

O limite de detecção do equipamento pode ser considerado como sendo a absorbância da linha base (em inglês, "*baseline flatness*") declarada pelo fabricante como sendo a intensidade absorbância de 0,001 UA. De forma a se obter o Limite de Detecção do Método, LDM, foi tomada a leitura do sinal do sensor na medição de branco de laboratório, resultante de preparação de volume de água destilada tal como uma amostra. A leitura de máxima amplitude retornou valores próximos ao valor de 0,001 UA, sendo considerada, portanto, o Limite de Detecção do Método. Colocando tal absorbância em termos de concentração, considerando a inclinação da reta típica de calibração e o Fator de Correção de Volume (ver Eq. 13, $K_C = 1,3826$), passando pela origem, obtém-se que:

$$\text{Limite de Detecção do Aparelho: } LD = 0,0014 \text{ mg/L P}$$

Quanto ao Nível de Quantificação de fósforo em amostras por técnica espectrofotométrica, as diferentes literaturas apresentam valores entre 0,005 UA (Lana et ali.), o que corresponde nesta calibração a 0,0069mg/L, e 0,010mg/L (APHA, 2012).

O Limite de Detecção do Método, LDM, pode ser estimado pela fórmula:

$$LDM = (t) \times (DP)$$

Foram formuladas 7 (sete) amostras de laboratório, de concentração múltipla de tal limite (adotada em 0,004 mg/L P), obtendo-se os seguintes resultados:

Conc. [mg/L]	Núme- ro de amos- tras	Absor- bância. (media- na) [UA]	Concen- tração Equiva- lente [mg/L P]	Desvio Padrão, DP [UA]	Desvio Padrão, DP [mg/L P]	t (con- stante de Student, para n=7)	LDM [mg/L]
0,004	7	0,0136	0,0188 mg/L	0,0033	0,0046	3,14	0,0143

Tabela 16: Dados para a determinação do Limite de Detecção do Método proposto.

Para fins práticos, será considerado o valor correspondente a aproximadamente 0,011 UA, definindo o valor de 0,015 mg/L, sendo este valor adotado como Limite de Detecção deste Método.

Para o Limite de Quantificação do Método, será adotada concentração de 0,04 mg/L de P.

Limite de Detecção do Método: $LDM = 0,015\text{ mg/L P}$

Limite de Quantificação do Método: $LQM = 0,040\text{ mg/L P}$

4.1.4 Experimento 4: Verificação de Performance de Laboratório

Sistematicamente, Brancos de Laboratório Fortificados (BLF, ou amostras de laboratório) devem ser analisados junto com as amostras de forma a verificar a recuperação do método, a qual deve estar na faixa entre 90 e 110%.

Foram preparadas 25 amostras de laboratório com concentrações diferentes, porém iguais àsquelas das soluções padrão de calibração. Os resultados das leituras das amostras foram analisados estatisticamente para serem utilizados na determinação dos Limites de Controle, dados pelas fórmulas:

Limite de Controle Superior: $LCS = x + 3(DP)$

Limite de Controle Inferior: $LCI = x - 3(DP)$

conc. padrão [mg/L]	qtd	leituras [UA]	Mediana teor, x [mg/L]	DP [mg/L]	LCS [mg/L]	LCI [mg/L]
0,20	5	0,11934;0,11863;	0,1650	0,0007	0,1670	0,1630
		0,11926;0,11933;				
		0,11999				
0,40	5	0,25290;0,25427;	0,3497	0,0011	0,3528	0,3465
		0,25221;0,25311;				
		0,25267				

0,60	5	0,38783;0,39330;	0,5363	0,0057	0,5533	0,5193
		0,39082;0,38792; 0,38232 0,50450;0,51089;				
0,80	5	0,51406;0,51343; 0,51339 0,64420;0,63745;	0,7098	0,0055	0,7263	0,6934
		0,62326;0,61007; 0,60252				
1,00	5					

Tabela 17: Resultados das leituras na determinação dos Limites de Controle Superior e Inferior dos valores padrão para as concentrações de 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,00mg/L P, utilizando 5 amostras de laboratório fortificadas, na calibração da Eq. 13 ($K_C = 1,3826$).

teor [mg/L] referên- cia	mediana, x [mg/L]	LCS [mg/L]	Recup. [%]	LCI [mg/L]	Recup. [%]	Maior Erro [%]	conc. [mg/L]
0,1724	0,1650	0,1670	96,85	0,1630	94,53	-5,47	0,20
0,3448	0,3497	0,3528	102,33	0,3465	100,48	+2,33	0,40
0,5172	0,5363	0,5533	106,97	0,5193	100,39	+6,97	0,60
0,6896	0,7098	0,7263	105,31	0,6934	100,54	+5,31	0,80
0,8621	0,8617	0,9349	108,44	0,7886	91,48	-8,52	1,00

Tabela 18: Determinação do erro das leituras dos Brancos de Laboratório Fortificados - BLF na verificação da conformidade dos resultados, os quais devem estar no interior da faixa de 90 a 110% do valor de referência.

Entre as amostras, foram formuladas soluções com concentração central (adotada como 0,6mg/l) em relação à faixa de detecção ideal (0,2 a 1,0 mg/l), sendo esta solução considerada a Solução de Verificação e Performance do Instrumento (SVPI), a qual foi mantida em registro de

performance do instrumento e método. Os resultados das leituras dos ensaios da solução SVPI estão sumarizados na Tabela 19.

SVPI Padrão Inter-no conc. [mg/L]	teor [mg/L]	ABS à 880nm [UA]	Curva Cal.	conc. [mg/L]	Recup. [%]	Erro [%]	Oper.	Data
			K _c					
0,6	0,517	0,391	1,383	0,540	104,40	4,40	PCF Cassius	28/03/2014
0,6	0,517	0,388	1,372	0,532	102,89	2,89	PCF Cassius	09/04/2014
0,6	0,517	0,386	1,379	0,532	102,87	2,87	PCF Cassius	24/04/2014
0,6	0,517	0,391	1,408	0,550	106,37	6,37	PCF Cassius	06/05/2014
0,6	0,517	0,386	1,395	0,539	104,14	4,14	PCF Cassius	20/05/2014
0,6	0,517	0,383	1,354	0,519	100,25	0,25	PCF Cassius	02/06/2014
0,6	0,517	0,382	1,371	0,524	101,27	1,27	PCF Cassius	05/06/2014
0,6	0,517	0,388	1,390	0,539	104,18	4,18	PCF Cassius	09/06/2014

Tabela 19: Registro dos resultados para controle interno das leituras da Solução de Verificação de Performance do Instrumento - SVPI.

4.1.5 Experimento 5: Análise da Concentração do Analito após a Digestão

A etapa de digestão no processo de determinação da concentração do teor total de fósforo (Fósforo Total) acrescenta uma incerteza nos resultados. Foi realizado um experimento comparativo entre a determinação do teor de ortofosfato (Fósforo Reativo), cuja determinação não exige uma digestão da amostra e a determinação de Fósforo Total. Foi incluída no exame a determinação do teor de Fósforo Hidrolisável (P-hidro), o qual exige uma digestão mais leve da amostra, sem a adição do reagente persulfato de potássio.

Para a determinação de Ortofosfato, foi confeccionada uma curva de calibração sem digestão. Para a determinação de Fósforo Total, foi

confeccionada uma curva de calibração digerida. A determinação da concentração de P-hidro foi obtida com a calibração digerida.

	Resultados das Leituras						
conc. padrão [mg/L]	0	0,2	0,6	1,0	regressão linear, CP = K _C * Abs		
	Absorbância, leituras à 880nm [UA]				K _C	DP Cal.	r*
Curva Calib. Não Dig	-0,0034	0,1267	0,3830	0,6363	1,3539	0,0029	0,9999
Curva Claib. Digerida	0,0008	0,1313	0,3819	0,5839	1,4356	0,0299	0,9983
Diferença [%]	N/A**	+3,65	- 0,27	- 8,24	+6,03	-	-

Tabela 20: resultados das leituras e regressão linear das medições dos padrões de calibração.

* Coeficiente Linear de Pearson, r, equivalente à raiz quadrada do Coeficiente de Correlação r².

** Não computado.

Observa-se que a variação entre as leituras obtidas nas análises das soluções padrão digeridas e não digeridas encontra-se entre valores percentuais aceitáveis (menores que 10%). Substituindo-se os valores de absorbância nas equações das curvas de calibração, observa-se que os valores absolutos, em mg/L, encontram-se no interior dos limites de controle já avaliados.

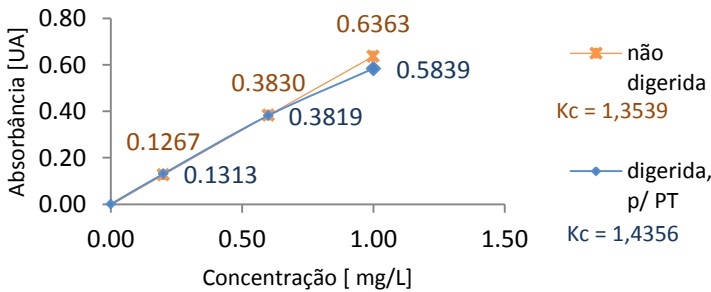


Figura 9: Gráfico de leituras de absorbância entre os pontos de calibração de curva não digerida, em alaranjado, e de curva digerida, em azul.

Adoção de Curvas de Calibração

O laboratório, após verificação de controle e performance rotineiras, mantendo registro das verificações, pode adotar curva de calibração padrão. Nos experimentos que envolvem digestão de amostras para a determinação das espécies Fósforo Hidrolisável (P-Hidro) e Fósforo Total (PT), não foram verificadas variações significativas entre os valores de absorbância e concentração entre amostras padrão (água destilada reagida com a solução de reagente combinado) digeridas e não digeridas.

Para os experimentos seguintes, foram adotados os seguintes valores da constante K_C das curvas de calibração:

Para a Curva de Calibração Não Digerida : $K_C = 1,3538$

Para a Curva de Calibração Digerida : $K_C = 1,4356$

Análise para a determinação das espécies de fósforo

Foi tomada uma alíquota de uma das amostras preservadas, sendo tal volume analisado logo após a coleta. Foram realizados os procedimentos para a determinação das seguintes espécies de fósforo:

- a) Ortofosfato Total, ou Fósforo Reativo (PO_4);
- b) Fósforo Hidrolisável (P-Hidro);
- c) Fósforo Total (PT);

Todas as alíquotas foram filtradas para a retirada de material grosseiro em suspensão e precipitado, passando as alíquotas por chumaço de algodão em sistema de filtragem por vácuo.

Foram preparadas em série de tubos de ensaio diluições de 10%, 25%, 50% e 100%, objetivando-se encontrar resultados de absorbância adequados à faixa ideal, entre 0,2 e 0,6 UA.

Os resultados de concentração de fósforo foram corrigidos em background (branco), concentração (pela adição de reagentes) e diluição adotados. Os resultados finais podem ser vistos na Tabela 21.

Procedimento	Abs [UA]	K _c	CEQ* [mg/L P]	CV* *	Fator de Diluição	CP [mg/L P]
Sem digestão	0,4266	1,3539	0,5776	1,16	2 (50%)	1,340
Digestão c/ 1 mL sol. H ₂ SO ₄	0,4769	1,4356	0,6847	1,16	2 (50%)	1,588
Digestão c/ 1 mL sol. H ₂ SO ₄ + 0,5 g de K ₂ S ₂ O ₈ (persulfato de potássio)	0,5967	1,4356 ****	0,8566	1,16	2 (50%)	1,987

Tabela 21: Determinação das concentrações de Fósforo resultantes de diferentes procedimentos.

* ver Equação 9.

** Fator de Correção de Volume, ver Equação 10.

*** Para a análise de P-Hidro, foi utilizada a curva de calibração de PT.

Assim, obteve-se:

a) Conc. PO₄ = 1,340 mg/L P

b) Conc. P-Hidro = (1,588 - 1,340) mg/L P = 0,248 mg/L P

c) Conc. PT = 1,987 mg/L P

Análise de Branco de Método e de Amostras Ambientais

Foram feitas análises sistemáticas das soluções de branco para a avaliação da intensidade do sinal de absorbância nos procedimentos para determinação das diferentes espécies de fósforo em brancos de laboratório e em brancos de amostras ambientais. Os resultados de uma das rotinas estão presentes na tabela 22.

Observa-se que o valor de absorbância (Abs = 0,0795 UA) equivale a uma concentração de aproximadamente 0,10 mg/L, valor significativo indicando a necessidade de se realizar a correção de background com o uso de brancos nas análises de amostras ambientais que apresentam cor ou turbidez leve.

BRANCO	Abs [UA]	K _c	CP*** [mg/L]
Branco PO4	*	1,3539	*
Branco PO4 dig	0,00112	1,4356	0,0016
Branco Amostra PO4	0,07954	1,3539	0,1077
Branco Amostra P-hidro	0,03432	1,4356**	0,0493
Branco Amostra PT	-0,01371	1,4356	-0,0197

Tabela 22: Determinação do erro das leituras dos Brancos de Amostra, preparados em função da espécie de Fósforo examinada.

* Não determinado (branco do método)

** empregado o valor de calibração para a curva de digestão para Fósforo Total.

*** concentração corrigida em volume (fator = 1,16) e em diluição (FD = 1)

4.1.6 Experimento 6: Variação na Preservação das Amostras

Considera-se que os valores de concentração de fósforo e de ortofosfato presentes nas amostras elaboradas em laboratório são os mesmos, visto que o reagente padrão utilizado (Di-hidrogênio Fosfato de Potássio, KH_2PO_4) e a água de grau reagente não possuem formas orgânicas ou outras formas inorgânicas, tais como os polifosfatos. Contudo, nos corpos d'água naturais, notadamente aqueles afetados por lançamentos poluentes, a presença de diversas espécies de fósforo é frequente.

Este experimento avalia a influência das condições adversas de preservação da amostra ambiental em relação àquelas ideais, em relação a dois fatores:

- tempo de preservação
- temperatura de preservação

Foram coletadas amostras de água superficial ambiental de ponto em curso d'água aleatoriamente escolhido, mantendo-se uma das amostras resfriada a 4° C (Amostra AM1N), e outra mantida no frasco de coleta sem resfriamento (Amostra AM1P). Das amostras foram sendo então extraídas alíquotas para análise nas seguintes condições, obtendo-se os resultados, para a concentração de fósforo total, em mg/L P, mostrados na Tabela 23.

Alíquota	tempo de análise	temperatura	Conc. PT [mg/L P]
Alíquota 1	até 4 horas	resfriada, 4°C	2,6745
		ambiente, 22°C	2,5589
Alíquota 2	após 14 dias	resfriada 4°C	2,0986
		ambiente 22°C	0,52287

Tabela 23: Resultados das concentrações de fósforo total após análise com variações no tempo e temperatura de preservação das amostras.

Observa-se que não houve uma variação significativa nos valores obtidos entre a análise das alíquotas da amostra resfriada e não resfriada (-25%) para o período de até 4 horas até a análise. Contudo, observa-se significativa variação nas concentrações obtidas a partir das análises das alíquotas mantidas resfriada e não resfriada (variação de 401%), sendo ambas as amostras mantidas no mesmo tipo de frasco. Quanto à análise dos efeitos no período até os ensaios nas alíquotas retiradas da mesma amostra, no mesmo regime de preservação, observou-se que a amostra resfriada apresentou decréscimo na concentração do analito Fósforo Total da ordem de 20%, para a amostra resfriada, e de decréscimo de aproximadamente 80%, para a amostra não resfriada, indicando que a não preservação por resfriamento da amostra pode levar a um consumo do fósforo por microorganismos no processo de degradação da matéria orgânica no interior do frasco, transformando-o para formas orgânicas precipitadas, retidas no processo de filtração grosseira pelo qual passam as amostras em preparação para o ensaio previsto no método.

4.1.7 Experimento 7: Avaliação da Recuperação do Analito

Foram coletadas 4 amostras de águas superficiais ambientais de concentrações de fósforo desconhecidas. Das amostras foram retiradas três alíquotas de cada, sendo uma das alíquotas analisada para Fósforo Total diretamente. As outras duas foram fortificadas com 0,2 e 0,4 mg/L de P, com volume padrão, de concentração conhecida e detectável de ortofosfato, formando Amostras de Fortificadas de Laboratório (AFL), sendo então analisadas pelo método. Com os resultados, pode-se calcular a porcentagem de recuperação dos analitos em cada amostra, com o uso da fórmula (Eq. 3):

$$R\% = \left[\frac{(Cs - C)}{s} \right] \cdot 100$$

onde: R% = recuperação porcentual do analito
Cs = concentração da amostra fortificada, mediana.
C = concentração corrigida com a amostra, mediana.
s = concentração do analito adicionada à amostra

conc.	qtd	Cs [mg/L]	C [mg/L]	Conc. analito adicionado, s [mg/L]	R%
0,20	4	0,57732	0,36724	0,20	105,04
		0,77624	0,50808		134,08
		2,25660	2,09860		79,00
		1,03140	0,85544		87,98
0,40	4	0,75003	0,36724	0,40	95,70
		0,97769	0,50808		117,40
		2,49630	2,09860		99,43
		1,25340	0,85544		99,49

Tabela 24: Valores da Recuperações do analito Ortofosfato em amostra ambientais fortificadas digeridas.

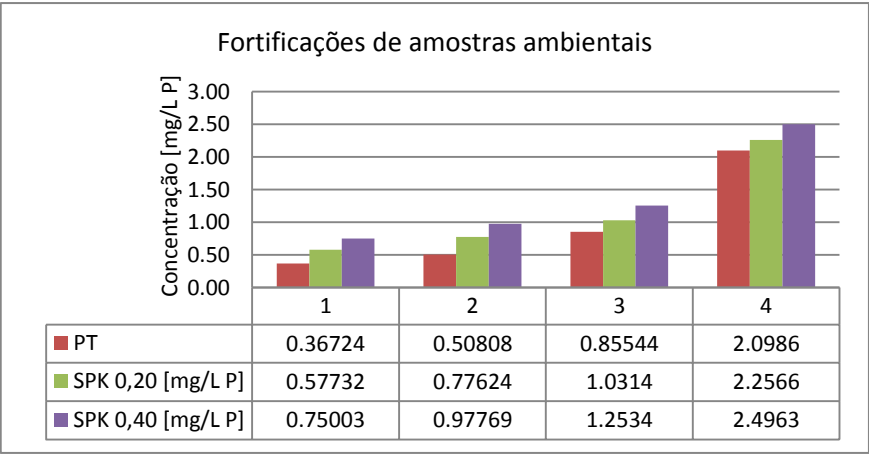


Figura 10: Resultado das concentrações obtidas pelos ensaios para a determinação de Fósforo Total das amostras ambientais fortificadas.

4.2 CLOROFILA A

Não foram utilizados padrões de clorofila *a* nos experimentos, implicando na impossibilidade de se realizar procedimentos de verificações de performance e validação do método.

As análises dos resultados se baseiam, portanto, nas análises dos valores de absorbância lidos pelo instrumento, os quais são qualitativamente classificados ou utilizados as fórmulas de modelos matemáticos validados por outros meios e presentes em metodologias adotadas por órgãos públicos na determinação de índices de qualidade de água, tais como o Índice de Estado Trófico - IET.

Por tratar-se de substância orgânica, a clorofila *a* está sujeita a condições de degradação naturais bem mais intensas que moléculas contendo íons inorgânicos, tal como o caso do fósforo em sua forma de ortofosfato. A clorofila é uma molécula orgânica metalizada, e a sua principal degradação está na perda de seu íon metálico Mg^{++} , quando esta transforma-se em feofitina, perdendo sua cor verde característica.

A perda do íon Mg^{++} se dá por efeito de temperatura, de pH e, mais naturalmente, pela incidência de luz solar. Em campo, as equipes de coleta de amostras realizam a amostragem em frascos plásticos logo protegidos da luz solar, de forma a evitar a degradação da amostra.

4.2.1 Experimento 8: Análise de Amostra Ambiental para a Determinação de Clorofila 'a'

A Tabela 27 apresenta a localização das coletas de amostras ambientais e os resultados obtidos a partir das análises das amostras para os analitos de interesse. Os valores das concentrações de fósforo foram obtidos em experimentos anteriores.

ponto	descrição	P total [mg/L P]	Clorofi- la [µg/L]	Feofitina [µg/L]	IET (PT)	IET (CL)	IET
1	córrego campus	2,0963	6,4788	18,3844	37,7849	66,2732	52,0291
2	lagoaHU anterior	0,7144	14,1541	56,3242	32,4265	59,7259	46,0762
3	lagoaHU posterior	0,8554	10,6049	110,4003	33,5179	58,3098	45,9139

Tabela 25: relação dos pontos de coleta das amostra ambientais

Com base nos resultados, pode-se determinar o valor do Índice de Estado Trófico - IET, consultado em, pnqa.ana.gov.br/IndicadoresQA/IndiceET.aspx, com base nas formulações, já acrescentando as formulações para clorofila *a* (sub-seção 4.2), para águas correntes:

$$IET (PT) = 10 \left(6 - \left(\frac{0,42 - 0,36(\ln. PT)}{\ln 2} \right) \right) - 20 \quad (\text{Eq. 14})$$

$$IET (CL) = 10 \left(6 - \left(\frac{-0,7 - 0,6(\ln. CL)}{\ln 2} \right) \right) - 20 \quad (\text{Eq. 15})$$

e para reservatórios:

$$IET (PT) = 10 \left(6 - \left(1,77 - \frac{0,42(\ln. PT)}{\ln 2} \right) \right) \quad (\text{Eq. 16})$$

$$IET (CL) = 10 \left(6 - \left(\frac{0,92 - 0,34(\ln. CL)}{\ln 2} \right) \right) \quad (\text{Eq. 17})$$

onde: PT: conc. de fósforo total medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;
CL: concentração de clorofila *a* medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;
ln: logaritmo natural.

O Índice IET consultado em tabela é resultante da média aritmética entre os dois Índices:

$$IET = \frac{IET (PT) + IET (CL)}{2} \quad (\text{Eq. 18})$$

Os valores do IET são classificados segundo classes de estado tróficos, apresentadas na tabela abaixo, juntamente com suas características.

Valor do IET	Classes de Estado Trófico	Características
≤ 47	Ultraoligotrófico	
$47 < \text{IET} = 52$	Oligotrófico	Corpos d'água limpos, de baixa produtividade, em que não ocorrem interferências indesejáveis sobre os usos da água, decorrentes da presença de nutrientes.
$52 < \text{IET} = 59$	Mesotrófico	Corpos d'água com produtividade intermediária, com possíveis implicações sobre a qualidade da água, mas em níveis aceitáveis, na maioria dos casos.
$59 < \text{IET} = 63$	Eutrófico	Corpos d'água com alta produtividade em relação às condições naturais, com redução da transparência, em geral afetados por atividades antrópicas, nos quais ocorrem alterações indesejáveis na qualidade da água decorrentes do aumento da concentração de nutrientes e interferências nos seus múltiplos usos.
$63 < \text{IET} = 67$	Supereutrófico	Corpos d'água com alta produtividade em relação às condições naturais, de baixa transparência, em geral afetados por atividades antrópicas, nos quais ocorrem com frequência alterações indesejáveis na qualidade da água, como a ocorrência de episódios florações de algas, e interferências nos seus múltiplos usos
> 67	Hipereutrófico	Corpos d'água afetados significativamente pelas elevadas concentrações de matéria orgânica e nutrientes, com comprometimento acentuado nos seus usos, associado a episódios florações de algas ou mortandades de peixes, com consequências indesejáveis para seus múltiplos usos, inclusive sobre as atividades pecuárias nas regiões ribeirinhas.

Tabela 26: Classe de estado trófico e suas características principais. Fontes: CETESB, 2011.

Os valores obtidos para os Índices de Estado Trófico correspondentes aos pontos dos corpos d'água amostrados apontaram uma condição trófica satisfatória (estado ultraoligotrófico, para as amostras da lagoa, e oligotrófico, para a amostra do córrego). Contudo, ambos os corpos d'água são receptores de efluentes domésticos de águas residuárias e sanitárias, contendo forte carga de nutrientes. Os valores baixos do Índice pode representar um corpo d'água o qual, mesmo

contendo alta carga de fósforo (aproximadamente 500% acima do limite de classificação de corpos d'água Classe 3, para o melhor dos casos), tais corpos não recebem luz solar diretamente na maior parte do seu trecho urbano, examinado. A não incidência da luz impede a proliferação de algas no ambiente aquático.

4.2.2 Experimento 9: Análise do Aspecto do Espectrograma da Clorofila

Este experimento tem por objetivo investigar os aspectos do espectrograma de absorvância de solução de clorofila em acetona. A absorvância da clorofila *a* possui pico na frequência do comprimento de onda de 665 nm.

Foi preparada em laboratório uma solução obtida a partir da maceração de aproximadamente 100 gramas de folhas de espinafre recentemente colhidas, a qual foi adicionada água destilada até o volume de 250 mL. Em seguida foram realizados os procedimentos descritos na metodologia apresentada na seção 3.2 para a preparação das amostras por filtração e extração da clorofila em solução de acetona e água 9:1 v/v. O extrato foi analisado em Espectrofotômetro em diferentes concentrações, sendo os resultados de absorvância resumidos na tabela abaixo.

Amostra	Dil.	vol.*	Abs [UA]					
			750nm, b**	665nm , b	663nm , b	750nm, a	665nm, a	663nm, a
Clorofila	100%	50 mL	0,1117	0,3892	0,3956	0,0115	0,1992	0,1889
	75%		0,0621	0,2975	0,3033	0,0076	0,1423	0,1432
	50%		0,0199	0,1471	0,1505	0,0049	0,1170	0,1190
	25%		0,0179	0,0882	0,0900	0,0148	0,0694	0,0699

Tabela 27: Resultados das leituras de absorvância em diferentes comprimentos de onda para amostras em diferentes diluições contendo Clorofila.

* volume filtrado

** b = antes da acidificação; a = depois da acidificação.

Amostra	Dil.	Clorofila'a' [ug/L]	Feofitina 'a' [ug/L]	IET(CL)	IET**
Clorofila	100%	93,83	110,40	89,41	44,71
	75%	99,24	320,15	89,90	44,95
	50%	568,67	-64,35*	105,01	52,50
	25%	514,23	188,18	104,14	52,07

Tabela 28: Resultados das leituras de absorvância em diferentes comprimentos de onda para amostras em diferentes diluições contendo Clorofila.

* valores negativos devem ser considerados iguais a zero.

** na ausência de um dos parâmetros, o Índice IET equivale à metade do parâmetros disponível.

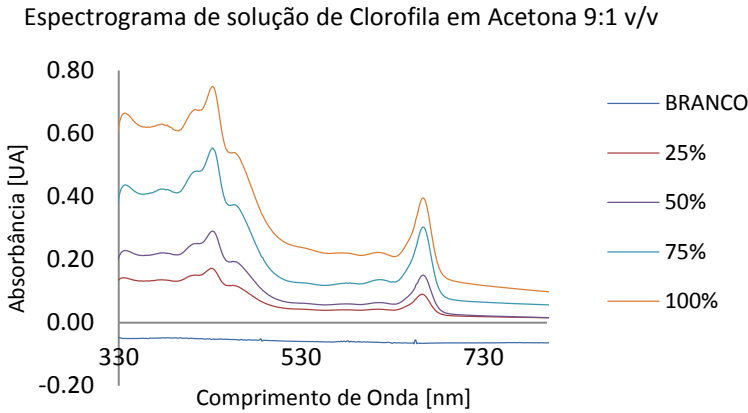


Figura 11: Espectrogramas de Absorvância de diferentes diluições de solução em Acetona 9:1 de Clorofila obtida a partir de maceração de folhas vegetais.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Experimento 1, observou-se que os procedimentos previstos na metodologia proporcionaram a realização de curva de calibração apresentando excelente linearidade para análises a partir de soluções padrão contendo o analito puro " KH_2PO_4 ". Observou-se que a curva de absorbância perde linearidade em absorbâncias acima de 0,6 UA, correspondendo a valores de concentração em mg/L de P acima de 1,0 mg/L. Foi adotada a faixa de calibração entre 0,2 e 1,0 mg/L de P. A curva de absorbância deve ser determinada com as soluções padrão nas concentrações de 0,2; 0,6 e 1,0 mg/L P. Na configuração do software de controle do instrumento, o ChemStation 1111G, para as reações típicas utilizando o volume de 1,6 mL de reagente combinado para cada 10 mL da solução padrão, nos tubos de ensaio, o teor da solução padrão deve ser corrigido pelo fator 0,862. O software de controle gera automaticamente a curva de calibração, por regressão linear, forçando a passagem pela origem ($C(0)=0$, ou $b=0$), fazendo com que a reta obtida tenha o modelamento em $C = K_C \times \text{Abs}[\text{UA}]$, sendo K_C igual a inclinação da reta de calibração.

O Experimento 2 indicou que a viabilidade das soluções padrão nas concentrações escolhidas de 0,2 e 0,6 mg/L P pode chegar a pelo menos 120 minutos, visto que a variação das absorbâncias lidas em relação a uma medição central, (escolhida a 15 minutos) foi, para ambas concentrações ensaiadas, menor que 1%. Observou-se que as leituras de absorbância apresentavam decréscimo contínuo com a repetição das leituras para a concentração padrão 0,20 mg/L P, e acréscimo contínuo para a concentração padrão de 0,60 mg/L P, indicando a presença de Efeito *Drift* (variação entre o sinal eletrônico da luz na fonte, I_0 e da luz incidente no sensor, I), com erro de absorbância nas extremidades da faixa de calibração, o qual pode ser causado por variações nos componentes eletrônicos do equipamento. Ainda, tal variação pode ser causada por uma provável fotodegradação das amostras pela incidência da radiação luminosa durante os ensaios no equipamento.

O Experimento 3 obteve resultados que apontaram para um Limite de Quantificação do Método igual a 0,040 mg/L P, em análise com solução padrão (analito puro).

O Experimento 4 apresentou resultados indicando que as medições obtidas pela análise de soluções padrão não digeridas estiveram dentro do limite inicial de controle (entre 90% e 110%) nas leituras. A solução padrão de verificação SVPI, formulada na

concentração 0,60 mg/L P, apresentou estabilidade ao longo do segundo trimestre de 2014, com recuperações entre 100,25 e 106,37%.

A partir do Experimento 5, inclusive, foram realizados procedimentos acrescentando a etapa de digestão de amostras contendo apenas o analito puro (KH_2PO_4 , padrão de ortofosfato PO_4), e também de amostras (matrizes) ambientais, para a determinação de outras espécies de fósforo, sendo o Fósforo Hidrolisável e a Fósforo Total.

O Experimento 5 mostrou a obtenção, pelo método proposto, de curvas de calibração com excelente linearidade ($R > 0,995$) e leituras de zero (valores corrigidos por branco) abaixo da absorbância correspondente ao limite de quantificação do método, indicando boa qualidade das curvas.

Os valores de K_C , iguais a 1,3539 e 1,4356 adotados, correspondentes às curvas de calibração não digerida e digerida, respectivamente, apresentaram baixa variação (+6,03%). Contudo, observou-se que o valor de absorbância correspondente ao resultado da digestão da solução padrão de 1,0 mg/L P ($\text{Abs} = 0,5839$, sem correções de teor) foi responsável por grande parte do desvio em relação ao valor obtido da análise da solução padrão de mesma concentração, porém sem digestão ($\text{Abs} = 0,6363$).

Nas análises para a determinação das espécies digeridas de fósforo (p-Hidro e PT), obteve-se congruência nos valores finais de concentração resultantes, indicando que na amostra ambiental, após a digestão com 1 mL de solução de Ácido Sulfúrico e fervura, foi disponibilizada uma fração (0,248 mg/L P) de fósforo em forma de ortofosfato, determinando-se a concentração de Fósforo Hidrolisável. Após digestão completa da amostra ambiental, com a adição de 1 mL de solução de ácido sulfúrico e de persulfato, com fervura), foi disponibilizada em ortofosfato ainda outra fração (0,699 mg/L P) de fósforo, obtendo-se a concentração de 1,987 mg/L de P para o indicador Fósforo Total.

O Experimento 6 mostrou que houve variação nas concentrações de uma amostra com a variação nas condições de preservação (tempo e temperatura). A variação da concentração de PT da amostra resfriada e logo analisada após a coleta ($\text{CP} = 2,675$ mg/L P) em relação à amostra tardiamente analisada sem preservação ($\text{CP} = 0,523$ mg/L P) foi de perda de aproximadamente 80% do analito Ortofosfato.

O Experimento 7 mostrou resultados de recuperação de analito Ortofosfato em geral bastante satisfatórios na série de fortificações com concentrações com soluções do padrão KH_2PO_4 com concentrações de

0,2 e 0,4 mg/L P em amostras ambientais, sendo as recuperações variando entre 79% e 134%, mantendo médias próximas à 100%.

Quanto à análise para a determinação da concentração de clorofila, determinada de forma modelada (uso de equação em detrimento do uso de padrões certificados), o Experimento 8 (subseção 4.2.1) apresentou valores de clorofila obtidos a partir de análises de amostras ambientais em três pontos de coleta em corpos d'água superficiais, sendo um deles em ambiente lótico (córrego) e dois outros em ambiente lêntico (lagoas). Os resultados obtidos indicaram baixa presença de clorofila, indicando que os processos de eutrofização dos corpos d'água analisados, os quais apresentaram alta concentração de fósforo, estão limitados por outros fatores, provavelmente pela ausência de luz solar incidente sobre a superfície/espelho d'água, haja vista a cobertura total por plantas aquáticas flutuantes.

No Experimento 9, foram analisadas alíquotas de solução de clorofila obtida pela maceração de folhas vegetais frescas. A extração da clorofila retida em filtração foi feita em solução aquosa de Acetona 9:1 v/v. Os resultados obtidos pela formulação matemática apresentaram variações muito altas (~500%) entre os valores para as diluições de 25 e 50% e a diluição de 75%, a qual esteve próxima ao valor de análise da amostra sem diluição. Não obstante, os valores de absorbância obtidos apresentaram resultados bastante coerentes com as diluições adotadas (25%, 50% e 75% do valor de absorbância obtido da amostra sem diluição, ver Figura 11).

5.1 Considerações a respeito do método

O método proposto trata-se de compilação de diversos métodos de adoção generalizada por laboratórios privados e da administração pública em diversos países.

O método prevê a utilização do Espectrofotômetro Agilent 8453, com software de controle, utilizando célula de fluxo, equipamento de uso padrão das Unidades de Criminalística da Polícia Federal em todo o país.

A técnica de célula de fluxo possui diversas vantagens sobre os procedimentos com células comuns, principalmente por não ser necessária sua retirada para a colocação das amostras, com menor perigo de contaminação das paredes externas e trocas mais rápidas de amostra. O sensor em Arranjo de Diodos DAD evita o efeito de luz difusa, pois não há mecanismos móveis, provendo alta resolução, com melhor distinção de picos de absorbância.

Ao equipamento é recomendável o acoplamento de amostrador automático, pois pela automação dos procedimentos pode ser obtida maior rapidez nas análises, menor contaminação das amostras e maior padronização dos procedimentos.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do método proposto utilizando-se equipamento de Espectrofotometria UV-Vis gerou resultados satisfatórios nas análises das amostras para a determinação de espécies de fósforo pela leitura das concentrações do íon inorgânico Fosfato (PO₄-3), indicando o potencial das Unidades de Criminalística da Polícia Federal para a realização sistemática de tais ensaios.

Os procedimentos de Controle de Qualidade (CQ) e Verificação de Performance (VP) previstos no método retornaram resultados indicando o controle do laboratório do SETEC/SC sobre o Método proposto.

O desenvolvimento de métodos de análise de água deve ser colocado como prioritário nas políticas de desenvolvimento dos Grupos de Trabalho em Perícias de Meio Ambiente das Unidades de Criminalística da Polícia Federal, visto que as Resoluções do CONAMA que regulam a matéria prevêm que análises de qualidade de água deverão ser realizadas por "laboratórios aceitos pelo órgão ambiental competente" e que os laboratórios "deverão ter sistema de controle de qualidade analítica implementado" (CONAMA n°357/2005).

Assim como foi proposto para a determinação das espécies de fósforo, outros ensaios podem ser realizados a partir do desenvolvimento de métodos específicos como, por exemplo, para a determinação das formas de Nitrogênio (p.ex., nitrato, nitrito e amônia) e de outros íons inorgânicos de interesse pericial nas respostas às quesitações formuladas sobre dano ambiental.

REFERÊNCIAS

ANA - Agência Nacional de Águas. Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água. 1ª edição. Brasília, 2013.

Agilent Technologies; Apostila do Curso H5927A-: Fundamentos de Espectrofotometria Molecular UV-Vis. Barueri, 2013.

Agilent Technologies; Apostila do Curso H5928A: Operação do Espectrofotometro UV-Vis. Barueri, 2013.

Agilent Technologies; “Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System - Instalation Guide”. G1115-90022. Ed. 10/2003. Alemanha, 2003.

APHA; “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”. 22nd edition. American Public Health Association - APHA, 2012.

ANDERSON, G.; BOWMAN, G.. *Who wants to be a Phosphorus and Ammonia Expert?!*. Disponível em : http://dnr.wi.gov/regulations/flabcert/documents/training/tp_nh31.pdf. Wisconsin State Laboratory of Hygiene, Univ. of Wisconsin. Consulta em 26/12/2011.

CETESB, disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/%C3%A1guas-superficiais/108-%C3%ADndices-de-qualidade-das-%C3%A1guas>. Consulta em 26/12/2011.

LANA, P.C et ali. *Avaliação ambiental de estuários brasileiros : diretrizes metodológicas*. Série Livros, 22. Museu Nacional: Rio de Janeiro, 2006.

MAROTTA, H et al.. *Monitoramento Limnológico: um Instrumento para a Conservação dos Recursos Hídricos no Planejamento e na Gestão Urbano-Ambientais*. Ambiente & Sociedade. Vol. XI, n.1, p 67-79. Campinas, jun/2008.

SILVERSTEIN, R.M.. *Spectrometric identification of organic compounds*. 5th ed - Ch.7. John Wiley, 1991.

STREIT, N.M et al. *As Clorofilas*. Ciência Rural, vol. 35, n3. Santa Maria/RS.

USEPA. "METHOD 365.1 - DETERMINATION OF PHOSPHORUS BY SEMI-AUTOMATED COLORIMETRY". Rev. 2.0. Office of Research and Development of US-EPA. Cincinnati, OH, 1993.

WILSON, P.Chris; *Water Quality Notes*: Water Clarity (Turbidity, Suspended Solids, and Color). Department of Soil and Water Science. University of Florida. Gainesville, Florida, EUA. June, 2013.

WSLH. "ESS METHOD 150.1 - CHLOROPHYLL - SPECTROPHOTOMETRIC", revisão de 1991, editado pela Inorganic Chemistry Unit da Environment Science Section, Wisconsin State Lab of Hygiene em Madison, WI)